

# **Effekt av cystein på differensiering av myoblaster og lagring av lipiddråper i myotuber**

Studier på celler fra Sol8 og C2C12 cellelinjer

Masteroppgave i farmakologi for graden master i farmasi



**Arezo Hakimi**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015



# **Effekt av cystein på differensiering av myoblaster og lagring av lipiddråper i myotuber**

Studier på celler fra Sol8 og C2C12 cellelinjer

Masteroppgave i farmakologi for graden master i farmasi

**Arezo Hakimi**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Veiledere:

Førsteamanuensis Knut Tomas Dalen

Professor Arild Rustan

Stipendiat Yuchuan Li

© Arezo Hakimi

2015

Effekt av cystein på differensiering av myoblaster og lagring av lipiddråper i myotuber

Arezo Hakimi

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for ernæringsvitenskap, Det medisinske fakultet, i samarbeid med Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2014 til mai 2015.

Jeg vil takke mine veiledere, førsteamanuensis Knut Tomas Dalen, for god veiledning og hjelp og professor Arild Rustan for et godt samarbeid!

Jeg vil rette en spesiell stor takk til min veileder Knut Tomas Dalen for god oppfølging, faglig informasjon og støtte med laboratoriearbeid og oppgaveskriving under hele masterperioden. Jeg hadde ikke klart dette uten din hjelp! Hjertelig takk til stipendiat Yuchuan Li for god opplæring i lipiddråpeisolering og for hjelp til å ta fine bilder! Takk til Nadia Nabil Haj-Yasein for hjelp med Oil Red O-farging! Takk til Kenth Arne-Hansson for gode råd og tips til bilderedigering! Takk til Anne Randi Enget for hjelp til sonikering av prøver, og til alle andre ingeniører og ansatte på Norsk Transgensenter, spesielt Shaista Khan, for god gjestfrihet, godt humør, og omtenksomhet!

Jeg kan ikke takke nok min kjære mann, Zahir Mohammad, for utrolig godt støtte, inspirasjon og hjelp, ikke bare under masteråret, men gjennom hele farmasistudiet mitt! Det hadde vært umulig å gjennomføre studiet uten deg! Takk til mine nydelige barn, Ella og Sophia, for å være mine største inspirasjoner, for å fylle mine vanskelige dager med glede og for å tåle mitt fravær når dere trengte meg mest!

Hjertelig takk til mine snille og hjelpsomme foreldre, Mohammad Ishaq Hakimi og Khadija Hakimi, og til mine kjære søstre for hjelp og støtte med barna og for god inspirasjon! Uten deres hjelp hadde det vært veldig vanskelig!

Sist men ikke minst, takk til min kjære venninne og medstudent, Farzana Hamidi, for et hyggelig samvær og samarbeid under hele studiet! Det har vært en hyggelig, samtidig som stressende periode jeg kommer til å savne!

Oslo, mai 2015

Arezo Hakimi

# Abstract

**Introduction:** Overweight and obesity are the health problems that are constantly increasing among the world's population. A growing number of children, youth and adults are crossing the border for overweight and obesity, which is caused by changes in lifestyle and environment, characterized by high intake of energy rich food combined with low physical activity. The excess energy is converted to triglycerides (TG) which are normally stored in lipid droplets in adipocytes. Obesity is a state of increased storage of lipids and lipid droplets in the adipose tissue, which over time results in increased storage of lipid droplets in other tissues than adipose tissue, such as muscle, liver, pancreas and blood vessels. This in turn is believed to cause lipotoxicity and tissue dysfunction. Obesity is therefore associated with increased risk of common diseases such as cardiovascular diseases, metabolic syndrome, insulin resistance and type 2 diabetes (T2D). It is particularly abdominal obesity which seems to be a predisposing factor for T2D. Accumulation of intramyocellular triglyceride (IMTG) in obesity leads to activation of several pathogenic processes which probably cause the development of insulin resistance in skeletal muscle.

Several studies have shown a correlation between the sulfur-containing, semi-essential amino acid cysteine and obesity. There has been shown a positive correlation between total cysteine in plasma (tCys) and body mass index (BMI), and there is shown a positive linear relation between tCys and fat mass in humans. Moreover, studies in animals have among other shown that cysteine inhibits lipolysis in the fat cells of mice, but it is still unclear what connection cysteine actually has with BMI and fat mass, and if cysteine is a regulator of fat mass.

**Aims of the study:** Based on the previous studies that have shown a connection between cysteine and obesity, the main objective of this thesis was to investigate whether cysteine concentration in culture medium affected accumulation of lipid droplets in myotubes of mice, and whether it affected the differentiation of myoblasts of mice.

**Methods:** For investigating the effect of cysteine on accumulation of lipid droplets in myotubes, cells from Sol8 and C2C12 cell lines were seeded and differentiated first with regular cysteine concentration for 3 days. Cysteine concentration was subsequently reduced and the cells were stimulated to make lipid droplets with oleic acid (OA) for 24 hours prior to fixation or harvesting. Lipid droplets in fixed cells were stained with the fluorescent dye BODIPY (493/503), or with the non-fluorescent dye Oil Red O prior to morphological

observation using microscopy. Harvested Sol8 cells were used for quantifying triglycerides as a measure for lipid droplets, and for quantifying proteins and DNA as a measure for the number of cells. For investigating the effect of cysteine on differentiation of myoblasts, cells from Sol8 and C2C12 cell lines were plated and differentiated in differentiation medium with low cysteine concentration from the first day of differentiation. The cells were then stimulated to make lipid droplets with OA for 24 hours prior to fixation or harvesting. The fixed cells were used for morphological observation using microscopy, and the harvested cells were used for gene expression studies of several differentiation markers and muscle fiber genes using qRT-PCR.

**Results:** It was observed by microscopy that added OA accumulated in myoblasts instead of myotubes in C2C12 cells. This cell line was therefore not suitable for studying the accumulation of lipid droplets in myotubes. In Sol8 cells stained with BODIPY (493/503) it was not observed a noticeable difference in the accumulation of lipid droplets between myotubes treated with low or high cysteine concentration by microscopy. In Sol8 cells stained with Oil Red O it was observed more lipid droplets in myotubes treated with high cysteine concentration compared with myotubes treated with low cysteine concentration by microscopy. Upon quantitation of triglycerides, protein, and DNA it was also measured higher triglyceride, higher protein and a higher DNA concentration in Sol8 cell samples treated with high cysteine concentration compared with cell samples treated with low cysteine concentration. This indicated that low cysteine did not lead to less accumulation of lipid droplets, but probably to less cell proliferation and/or cell survival. It was observed by microscopy of Sol8 and C2C12 cells that low cysteine led to no or poor differentiation of myoblasts and that differentiation improved with increasing cysteine concentration. Gene expression studies showed that low cysteine concentration led possibly to impaired expression of Myod1 in Sol8 cells, to impaired expression of Mef2c in C2C12 cells, and to up-regulation of MYH7 expression in both cell lines.

**Discussion/Conclusion:** The results indicate that cysteine does not affect the accumulation of lipid droplets in myotubes, but that it probably affects cell proliferation, cell survival, and cell differentiation. Impaired expression of Myod1 in Sol8 cells and Mef2c in C2C12 cells may explain the effect of low cysteine on differentiation.

# Sammendrag

**Innledning:** Overvekt og fedme er helseproblemer som er i stadig økning blant befolkningen i hele verden. Stadig flere barn, ungdom og voksne passerer grensen for overvekt og fedme, noe som skyldes endringer i levevaner og miljø, preget av høyt energi-/kaloriinntak kombinert med lite fysisk aktivitet. Overskuddet av energi blir omdannet til triglyserider (TG) som normalt lagres i lipiddråper i fettceller. Fedme er en tilstand av økt lagring av lipider og lipiddråper i fettvev, noe som over tid fører til økt lagring av lipiddråper i andre vev enn fettvev, som muskel, lever, bukspyttkjertelen og blodkar. Dette fører antakelig igjen til lipotoksisitet og vevsdysfunksjon. Fedme er av den grunn assosiert med økt risiko for vanlige sykdommer som hjerte- karsykdommer, utvikling av metabolsk syndrom, insulinresistens og type 2 diabetes (T2D). Det er spesielt abdominal fedme som synes å være en disponerende faktor for T2D. Akkumulering av intramyocellulær triglydserid (IMTG) ved fedme fører til aktivering av flere patogene prosesser som trolig er med på utvikling av insulinresistens i skjelettmuskel.

Flere studier har vist en sammenheng mellom den svovelholdige, semi-essensielle aminosyren cystein og fedme. Det er blitt vist en positiv korrelasjon mellom totalcystein i plasma (tCys) og kroppsmasseindeks (KMI), og det er vist et positiv lineært forhold mellom tCys og fettmasse hos mennesker. Dessuten har studier i dyr blant annet vist at cystein hemmer lipolyse i musefettceller, men det er fortsatt uklart hvilken sammenheng cystein faktisk har med KMI og fettmasse, og om cystein er en regulator av fettmasse.

**Mål for oppgaven:** På bakgrunn av tidligere studier, som har vist en sammenheng mellom cystein og fedme, var hovedmålet for denne oppgaven å undersøke om cysteinkonsentrasjon i dyrkningsmedium påvirket lagring av lipiddråper i myotuber fra mus, og om den påvirket differensieringen av myoblaster fra mus.

**Metode:** For å undersøke effekt av cystein på lagring av lipiddråper i myotuber ble celler fra Sol8 og C2C12 cellelinjer sådd ut og differensiert først med vanlig cysteinkonsentrasjon i 3 dager. Deretter ble cysteinkonsentrasjon redusert og cellene ble stimulert til å lage lipiddråper med oljesyre (OA) i 24 timer før fiksering eller høsting. Lipiddråper i fikserte celler ble farget med det fluorescerende fargestoffet Bodipy (493/503), eller med ikke-fluorescerende fargestoffet Oil Red O før morfologisk observasjon ved hjelp av mikroskopering. Høstede Sol8-celler ble benyttet til å kvantifisere triglyserider som mål på lipiddråper, og til å



kvantifisere proteiner og DNA som mål på antall celler. For å undersøke effekt av cystein på differensiering av myoblaster ble celler fra Sol8 og C2C12 cellelinjer sådd ut og differensiert i differensieringsmedium med lav cysteinkonsentrasjon fra første differensieringsdag. Cellene ble så stimulert til å lage lipiddråper med OA i 24 timer før fiksering eller høsting. Fikserte celler ble benyttet til morfologisk observasjon ved hjelp av mikroskopering, og høstede celler ble benyttet til genekspresjonsstudier av en rekke differensieringsmarkører og muskelfibergener ved hjelp av qRT-PCR.

**Resultater:** Det ble observert ved mikroskopering at tilsatt OA akkumulerte i myoblaster istedenfor i myotuber i C2C12 celler. Denne cellelinjen var av den grunn ikke egnet for å studere lipiddråpelagring i myotuber. I Sol8 celler farget med Bodipy (493/503) ble det ved mikroskopering ikke observert en merkbar forskjell i lagring av lipiddråper mellom myotuber behandlet med lav mot høy cysteinkonsentrasjon. I Sol8 celler farget med Oil Red O ble det ved mikroskopering observert mer lipiddråper i myotuber behandlet med høy cysteinkonsentrasjon sammenlignet med myotuber behandlet med lav cysteinkonsentrasjon. Ved kvantifisering av triglyserider, proteiner og DNA ble det også målt høyere triglyserid-, høyere protein- og høyere DNA-konsentrasjon i Sol8 celleprøver behandlet med høy cysteinkonsentrasjon sammenlignet med celleprøver behandlet med lav cysteinkonsentrasjon. Dette tydet på at lav cystein ikke førte til mindre lipiddråpelagringen, men sannsynligvis til mindre celleprolifisering og/eller celleoverlevelse. Det ble observert ved mikroskopering av Sol8 og C2C12 celler at lav cystein førte til ingen eller dårlig differensiering av myoblaster og at differensieringen økte med økende cysteinkonsentrasjoner. Genekspresjonsstudier viste at lave cysteinkonsentrasjoner førte muligens til hemmet uttrykk av Myod1-uttrykk hos Sol8 celler, til hemmet uttrykk av Mef2c hos C2C12 celler, og til oppregulering av Myh7-uttrykk hos begge cellelinjene.

**Diskusjon/Konklusjon:** Resultatene indikerer at cystein ikke har en effekt på lagring av lipiddråper i myotuber, men at cystein trolig påvirker celleprolifisering, celleoverlevelse, og celledifferensiering. Hemming av Myod1-uttrykk hos Sol8 celler og av Mef2c-uttrykk hos C2C12 celler forklarer muligens effekt av lav cystein på differensieringen.

# Forkortelser

4E-BP1	4E-bindende protein 1
AA	Aminosyrer
AC	Adenylatsyklase
ACAT1	Kolesterol acyltransferase 1
ACAT2	Kolesterol acyltransferase 2
ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ACS	Acyl-CoA syntetase
Acyl-CoA	Acyl-koenzym A
ADP	Adenosindifosfat
ADR	Adrenerge reseptorer
AMPK	Adenosin monofosfataktivert proteinkinase
aPKC	Atypisk proteinkinase C
AQP7	Akvaporin 7
AT	Aktiv transport
ATGL	Fettvevstriglyceridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BCA	Bisinkoninicsyre
BMI	Body mass index
BP	Blodtrykk
BSA	Bovint serum albumin
CaMKII	Kalsium/kalmodulin-avhengig kinase II
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
CAT	Karnitin translokase

CBS	Cystationin $\beta$ -syntase
cDNA	Komplementært DNA
CDO	Cystein dioksygenase
CGI-58	Komparativ genidentifikasjon-58
cGMP	Syklisk guanylatmonofosfat
CO <sub>2</sub>	Karbondioksid
CPT-1	Karnitinpalmitoyl transferase 1
CPT-2	Karnitinpalmitoyl transferase 2
CRP	C-reaktivt protein
Ct-verdi	Syklus terskelverdi
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DGAT1	Diacylglycerol acyltransferase 1
DGAT2	Diacylglycerol acyltransferase 2
Diff.	Differensiering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTPS	Deoksynukleotider
dsDNA	Dobbeltrådet DNA
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase

E-rør	Eppendorfrør
FABP	Fettsyrebindende proteiner
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (redusert form)
FAT/CD36	Fettsyretranslokase
FATP1-6	Fettsyretransportproteiner 1-6
FBS	Føtal bovint serum
FFA	Frie fettsyrer
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Glyserol
GC	Guanylylsyklase
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferase
Gi	Hemmende G-proteiner
Gln	Glutamin
GLUT-4	Glukose transportør type 4
Gs	Stimulerende G-proteiner
GSH	Glutation
GTP	Guanosintrifosfat
G $\beta$ L	G-protein betaprotein-subenhetlignende
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
HCl	Hydrogenklorid
HDL	High-density lipoprotein
HSL	Hormonsensitiv lipase
IDDM	Insulinavhengig diabetes mellitus
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukin-6

IMCL	Intramyocellulære lipider
IMTG	Intramyocellulær triglydserid
IR	Insulinreseptor
IRS-1	Insulin reseptor substrat 1
I $\kappa$ K $\beta$	Inhibitor $\kappa$ B kinase $\beta$
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kg	Kilogram
KMI	Kroppsmasseindeks
LAT1	L-type aminosyre transportør 1 (System L)
LCFAs	Langkjedede fettsyrer
LDer	Lipiddråper
LPL	Lipoproteinlipase
m <sup>2</sup>	meter <sup>2</sup>
MAG	Monoacylglyserol
Met	Metionin
MetS	Metabolsk syndrom
MGAT	Monoacylglyserol acyltransferase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumklorid
MGL	Monoacylglyserol lipase
MilliQ H <sub>2</sub> O/dH <sub>2</sub> O	Milli-Q vann/Destillert vann
MLCK II	Myosin lettkjede-kinase II
mRNA	Messenger RNA
mTORC1	Mekanistisk target av rapamycinkompleks 1
MyHC	Myosin tung kjede
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (redusert form)

NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroksid
NEFA	Ikke-forestrede fettsyrer
NIDDM	Ikke-insulinavhengig diabetes mellitus
NP	Natriuretiske peptider
NPRA	Natriuretisk peptid reseptortype A
OA	Oljesyre
PA	Palmitinsyre
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor-1
PAT	<u>P</u> erilipin, <u>A</u> dipofilin og <u>T</u> IP-47 relaterte proteiner
PAT1	Proton-assistert aminosyretransportør 1
PB	Proteinnedbrytning
PBS	Fosfatbuffret saltvann
PC	Fosfatidylkolin
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PDK1	Fosfoinositid-avhengig kinase 1
PE	Fosfatidyletanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC $\lambda/\zeta$	Proteinkinase C $\lambda/\zeta$
PKG	Proteinkinase G
PP2A	Proteinfosfatase 2A
PS	Proteinsyntese
psi	Pounds per square inch

qRT-PCR	Kvantitativ sanntids-polymerasekjedereaksjon
RAGs	Ras-relaterte GTP-aser
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rotasjoner per minutt
RT	Revers transkriptase
S6K	Protein S6-kinase
SAM	S-adenosyl metionin
SE	Sterylester
SEM	Standardfeil
SNAT2	Natriumavhengig nøytral aminosyre transportør 2 (System A)
T1D	Type 1 diabetes
T2D	Type 2 diabetes
TAG/TG	Triacylglycerol/Triglyserid
TBP	TATA-bindende protein
TCA	Trikarboksylsyre
tCys	Total cystein
TFEB	Transkripsjonsfaktor EB
tHcy	Total homocystein
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alfa
ULK1	Unc-51-lignende autofagiaktiverende kinase 1
v-ATPase	Vakuolære H <sup>+</sup> -ATPase
VLDL	Very low density lipoprotein
WAT	Hvitt fettvev
WHO	Verdens Helseorganisasjon

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1	Overvekt og fedme .....	1
1.1.1	Abdominal fedme.....	2
1.2	Metabolsk syndrom .....	3
1.3	Diabetes mellitus .....	4
1.4	Insulinresistens i skjelettmuskel .....	5
1.5	Skjelettmuskulatur.....	7
1.5.1	Myogenese og differensiering.....	8
1.5.2	Oppbygning av skjelettmuskulatur .....	10
1.5.3	Muskelfibertyper.....	10
1.5.4	Generell energimetabolisme i skjelettmuskelfibrer .....	12
1.6	Lipiddråper .....	13
1.6.1	Oppbygning av lipiddråper .....	13
1.6.2	Den nøytrale kjernen.....	14
1.6.3	Fosfolipid monolaget.....	14
1.6.4	Lipiddråpeassosierte proteiner .....	14
1.6.5	Funksjon av lipiddråper i celler .....	15
1.6.6	Dannelse av lipiddråper .....	15
1.7	Lipolyse i skjelettmuskelceller kontra fettceller .....	16
1.7.1	Fettsyre- opptak og metabolisme i skjelettmuskelfibrer .....	18
1.7.2	Opptak av fettsyrer i mitokondrier .....	19
1.8	Opptak og metabolisme av proteiner og aminosyrer i skjelettmuskelceller.....	20
1.8.1	Aminosyrer .....	20
1.8.2	Proteiner og aminosyrer i skjelettmuskelceller .....	21
1.8.3	Aminosyretransportører i skjelettmuskelceller .....	21
1.8.4	Intracellulære aminosyresensorer i skjelettmuskelceller .....	23
1.9	Aminosyren cystein.....	23
1.9.1	Cystein og fedme.....	24
1.10	Substanser benyttet i forsøkene .....	26
1.10.1	Oljesyre .....	26
<b>2</b>	<b>Mål for oppgaven.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Materialer.....</b>	<b>28</b>
3.1	Kjemikalier .....	28
3.2	Utstyr .....	29
3.3	Instrumenter .....	30
3.4	Kits.....	31
3.5	Cellelinjer .....	31
3.6	Programvare og internettressurser .....	32
<b>4</b>	<b>Metoder .....</b>	<b>33</b>
4.1	Celledyrking.....	33
4.1.1	Generelle arbeidsrutiner i cellelaboratorium .....	33
4.1.2	Cellelinjer.....	34
4.1.3	Uttak av celler fra cellebank og utsåing i celledyrkningsflaske .....	34
4.1.4	Splitting av cellekultur .....	34
4.1.5	Nedfrysing av celler til cellebank .....	35
4.1.6	Celletelling og utsåing til forsøk i 12-brønners brett/petriskål .....	35



4.1.7	Differensiering og stimulering med oljesyre .....	36
<b>4.2</b>	<b>Fiksering av celler i 12-brønnersbrett og farging av lipiddråper med Oil Red O eller Bodipy 38</b>	
4.2.1	Farging med Bodipy og DAPI .....	38
4.2.2	Farging med Oil Red O .....	38
<b>4.3</b>	<b>Mikroskopering .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Kvantifisering av triglyserider .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Kvantifisering av proteiner .....</b>	<b>40</b>
4.5.1	Høsting av prøver i 12-brønnersbrett .....	40
4.5.2	Sonikering av prøver .....	40
4.5.3	Proteinmåling .....	41
<b>4.6</b>	<b>Kvantitativ Real-Time PCR (qRT-PCR) .....</b>	<b>42</b>
4.6.1	Høsting av prøver .....	43
4.6.2	Isolering av total RNA .....	43
4.6.3	Kvantifisering av RNA .....	44
4.6.4	Syntese av cDNA .....	46
4.6.5	Kvantitativ sanntids-PCR (qRT-PCR) .....	48
4.6.6	Analyse av qRT-PCR data .....	52
<b>4.7</b>	<b>Isolering av lipiddråper .....</b>	<b>53</b>
4.7.1	Høsting av prøver i 75 cm <sup>2</sup> petriskål .....	53
4.7.2	Isolering av lipiddråper .....	54
<b>4.8</b>	<b>Statistiske analyser .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>Effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber .....</b>	<b>58</b>
5.1.1	Effekt i C2C12 celler ved mikroskopering .....	58
5.1.2	Effekt i Sol8 celler ved morfologisk observasjon .....	60
5.1.3	Kvantifisering av triglyserider .....	64
5.1.4	Kvantifisering av proteiner .....	65
5.1.5	Kvantifisering av DNA .....	66
<b>5.2</b>	<b>Effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster til myotuber .....</b>	<b>68</b>
5.2.1	Effekt i Sol8 celler ved morfologisk observasjon .....	68
5.2.2	Effekt i C2C12 celler ved morfologisk observasjon .....	69
5.2.3	Identifisering av differensieringsmarkører i Sol8 celler ved qRT-PCR .....	71
5.2.4	Identifisering av differensieringsmarkører i C2C12 celler ved qRT-PCR .....	73
<b>5.3</b>	<b>Isolering av lipiddråper .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>79</b>
6.1	Oppsummering av oppgavens hovedfunn .....	79
6.2	Effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber .....	83
6.3	Effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster til myotuber .....	86
6.4	Isolering av lipiddråper .....	91
6.5	Veien videre .....	93
<b>7</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>100</b>
<b>9.1</b>	<b>Medier og stockløsninger til celledyrking .....</b>	<b>100</b>
9.1.1	50x Stock miks/Vitaminmiks (200 mL) .....	100
9.1.2	Basalmedium (1 L) .....	100
9.1.3	Vekstmedium (200 mL) .....	100
9.1.4	Frysemedium (10 mL) .....	100

9.1.5	Vanlig differensieringsmedium (200 mL) .....	101
9.1.6	L-Metionin (20 mM stockløsning) .....	101
9.1.7	L-Cystin (10 mM stockløsning) .....	101
9.1.8	Natriumpyruvat (1 M stockløsning) .....	101
9.1.9	Differensieringsmedier til cysteintitrering (200 mL) .....	101
<b>9.2</b>	<b>Stockløsninger til LD-stimulering med OA .....</b>	<b>102</b>
9.2.1	BSA (Bovint Serum Albumin) (2,4 mM stockløsning) .....	102
9.2.2	OA-BSA stockløsning (6 mM OA + 2,4 mM BSA) .....	102
<b>9.3</b>	<b>Reagenser til fiksering og farging .....</b>	<b>102</b>
9.3.1	Paraformaldehyd 4 % (500 mL) .....	102
9.3.2	Oil Red O løsning (100 mL) .....	102
<b>9.4</b>	<b>Reagenser til proteinmåling .....</b>	<b>103</b>
9.4.1	25 x Complete stock (400 µL) .....	103
9.4.2	RIPA-buffer (100 mL) .....	103
9.4.3	Lyseringsbuffer med RIPA og Complete (1 mL) .....	103
<b>9.5</b>	<b>Primere til qRT-PCR med SYBR<sup>®</sup> Green 1 .....</b>	<b>104</b>
<b>9.6</b>	<b>Reagenser til LD-isolering .....</b>	<b>104</b>
9.6.1	Tricin 1 M stockløsning (50 mL) .....	104
9.6.2	5x Buffer A (50 mL) .....	104
9.6.3	Buffer B uten sukrose (50 mL) .....	105
9.6.4	Buffer B med sukrose (50 mL) .....	105
9.6.5	1x PBS med 1x Complete (20 mL) .....	105

# 1 Innledning

## 1.1 Overvekt og fedme

Fedme er en tilstand av økt lagring av lipider og lipiddråper i fettvev som ofte fører til fettavleiring og økt lipiddråper i andre vev enn fettvev, som igjen fører til lipotoksisitet og vevsdysfunksjon [1]. Det er stadig flere barn og ungdom, og voksne menn og kvinner som passerer grensen for overvekt og fedme, noe som skyldes endringer i levevaner og miljø [2, 3].

Overvekt og fedme er assosiert med økt risiko for hjerte- karsykdommer og utvikling av type 2 diabetes (T2D). Det er spesielt økt midjeomfang/livvidde (abdominal fedme) som synes å være en disponerende faktor for T2D. Registrering av midjeomfang hos personer som får behandling for overvekt er derfor vanlig og brukes blant annet til å følge slankeprosessen. Ved trening erstattes fett med muskler, derfor kan slankingen vises bedre på midjemål enn på KMI (kroppsmasseindeks). Et midjemål over 102 cm hos men og over 88 cm hos kvinner regnes som høy risiko. Siden vekt og høyde henger sammen, anbefaler Verdens Helseorganisasjon (WHO) å bruke KMI i stedet for antall kilogram (kg) når normal vekt eller fedme skal defineres (Tabell 1). Det gir et bedre bilde av fettmengden i kroppen. KMI er et uttrykk for vekt i forhold til høyde og benyttes internasjonalt for å definere overvekt og fedme, og for å måle og sammenligne helserisikoen ved over- og undervekt i befolkningen. Ved vurdering av enkeltpersoners grad av overvekt og fedme er KMI ikke alltid like godt egnet fordi flere andre faktorer, som mengde muskelmasse og hvor fettet sitter, påvirker KMI og helserisiko, særlig risiko for utvikling av T2D [3, 4].

KMI beregnes ved formelen: **KMI = Vekt (kg)/Høyde<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)** [4].

**Tabell 1: WHO's definisjoner i forhold til KMI.** Tabellen er hentet fra [3].

Betegnelse	Kg/m <sup>2</sup>
Undervekt	< 18,5
Normal vekt	18,5-24,9
Overvekt	25-29,9
Fedme	Grad 1: 30-34,9 Grad 2: 35-39,9 Grad 3: ≥ 40

### 1.1.1 Abdominal fedme

Fedme er assosiert med insulinresistens og metabolsk syndrom (MetS) og bidrar til hypertensjon, forhøyet serumkolesterol, redusert HDL-kolesterol og hyperglykemi. I tillegg er fedme i seg selv assosiert med høy risiko for kardiovaskulære sykdommer [5]. Abdominal fedme er den mest utbredte formen av MetS. Fordeling av kroppsfett, særlig akkumulering av visceral fettvev er vist å ha stor sammenheng med metabolsk syndrom [6].

Studier har vist at pasienter med abdominal fedme er mer utsatt for å utvikle MetS, T2D og kardiovaskulære sykdommer enn de med subkutan fedme. Dette kan forklares med den anatomiske plasseringen av abdominal fedme, som gjør at frie fettsyrer (FFA) som er frigjort etter spalting av triglyserider (TG/TAG) fra abdominal fettvev fraktes delvis via portalvenen, mens FFA fra subkutan fettvev fraktes via det systemiske kretsløpet. Denne tilstrømningen av FFA mot leveren fører til økt frigjøring av TG-rikt lipoproteiner, redusert hepatisk nedbrytning av alipoprotein B og insulin. Dette resulterer i økt mengde alipoprotein B og hyperinsulinemi som igjen fører til økt hepatisk produksjon av glukose. I tillegg er de forstørrede abdominale fettcellene resistente mot den antilipolytiske effekten av insulin og har svekket evne til forestring av FFA. Akkumulering av det hyperlipolytiske fettvevet fører derfor til svekket FFA-metabolisme [6].

Hovedårsakene til overvekt og fedme i befolkningen er usunn livsstil, som innebærer lite fysisk aktivitet og høyt energi-/kaloriinntak, noe som fører til at overskuddet av energi blir omdannet til TG og lagret i lipiddråper i fettceller [3, 7]. Arv og psykiske faktorer spiller også en rolle hos enkeltpersoner. Nasjonal faglig retningslinje for forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme anbefaler forebyggende livsstilstiltak som bedre kosthold med blant annet mer grønnsaker, daglig fysisk aktivitet og røykeslutt for alle med overvekt og fedme [3, 8].

Flere studier har vist en positiv korrelasjon mellom total cystein (tCys) i plasma og KMI hos mennesker [9]. Studier har også vist et positivt lineært forhold mellom tCys og fettmasse, noe som forble robust selv etter justering for alder, kjønn, muskelmasse; inntak av protein, fett og total energi gjennom kosten og plasmalipidkonsentrasjoner. Det var dessuten vist at økning i tCys over 6 år var assosiert med høyere fettmasse ved oppfølging [10]. Disse studier og selve aminosyren cystein er beskrevet mer i detaljer senere i oppgaven.

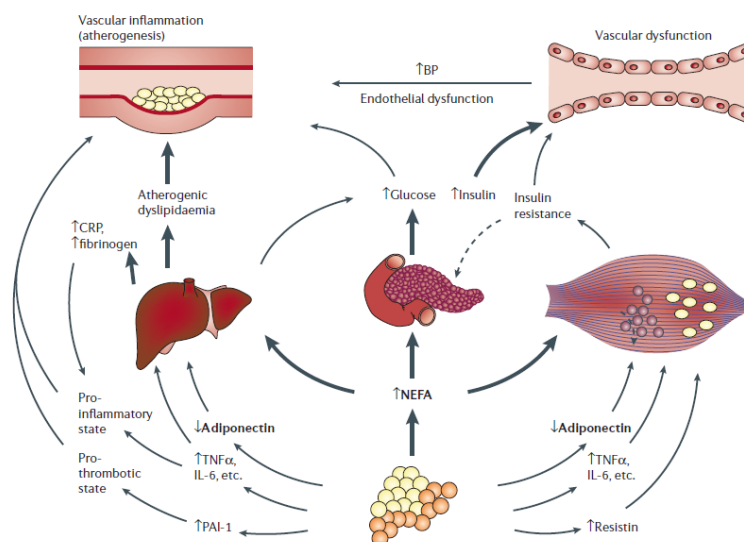
## 1.2 Metabolsk syndrom

Begrepet «metabolsk syndrom» (MetS), også kalt syndrom X, har eksistert i minst 80 år. Begrepet har fått en rekke definisjoner av ulike helse- og forskningsorganisasjoner som Verdens Helseorganisasjon (WHO) og «European Group for the Study of Insulin Resistance» (EGIR). Den siste og nyeste definisjonen av MetS ble utgitt av «International Diabetes Federation» (IDF) i 2006. Ifølge IDF er MetS definert som sentral fedme i tillegg til to eller flere av de fire følgende tilstandene: forhøyede triglyserider, redusert HDL-kolesterol, høyt blodtrykk (hypertensjon) og høyt fastende plasmaglukose (Tabell 2) [11] [12].

**Tabell 2: IDF's definisjon av metabolsk syndrom.** Tabellen er hentet fra [13].

Metabolsk syndrom
Sentral overvekt (livmål menn > 94 cm, kvinner > 80 cm (europeisk etnisitet), i tillegg til to eller flere av følgende tilstander:
<ul style="list-style-type: none"><li>• hypertensjon (blodtrykk &gt; 130/85)</li><li>• triglyserider &gt; 1,7 mmol/l</li><li>• HDL-kolesterol &lt; 1,0 mmol/l hos menn, &lt; 1,3 mmol/l hos kvinner</li><li>• fastende P-glukose &gt; 5,6 mmol</li></ul>

Samlet øker disse metabolske forstyrrelsene risikoen for type 2 diabetes (T2D) og hjertekarsykdommer, noe som krever terapeutisk oppmerksomhet for de med høy risiko. Antall personer med MetS har økt enormt på verdens basis i løpet av de to siste tiårene og denne økningen sammenfaller med den globale epidemien av fedme og diabetes [11]. Ifølge IDF har 20-25 % av verdens voksne befolkning MetS og disse har doblet risiko for å dø av og triplet risiko for å få hjerteinfarkt eller slag sammenlignet med de som ikke har syndromet. I tillegg har de fem ganger høyere risiko for å utvikle T2D. De underliggende årsakene til MetS er fortsatt uavklart, men de viktigste faktorene anses å være sentral fedme og insulin resistens. Arv, alder, hormonelle forandringer og en proinflammatorisk tilstand spiller også en viss rolle men er mer etnisk preget [5]. Livsstilsendringer som vektreduksjon og økt fysisk aktivitet er hovedtilnærmingene i behandling av MetS, men medikamentell behandling kan være nødvendig for å redusere risikoen for diabetes og kardiovaskulære sykdommer [11].



**Figur 1: Fedme og metabolsk syndrom.** Fettvev i overvektige personer produserer flere typer adipokiner som bidrar til utvikling av metabolsk syndrom. Etter spalting av triglyserider (lipolyse) frigjør fettvevet ikke-forestrede fettsyrer (NEFA) og opphopning av NEFA fører til at fett lagres i andre organer enn selve fettvevet, som muskel, lever og bukspyttkjertelen. Denne ektopiske lagringen av fett fører til insulinresistens, hyperinsulinemi og aterogen dyslipidemi. Fettvevet produserer lite adiponektin hos overvektige personer som er forbundet med insulinresistens og fettlever. Adipokiner som PAI-1, inflammatoriske cytokiner som TNF $\alpha$  og IL-6 og resistin, som overproduseres ved fedme, er med på utvikling av flere metabolske risikofaktorer som proinflammatorisk og protrombotisk tilstand, insulinresistens og fører til vaskulær dysfunksjon og aterogenese enten direkte via de metabolske risikofaktorene eller ved å virke direkte på arterieveggen. BP (blodtrykk), CRP (C-reaktivt protein). Figuren er hentet fra [14].

### 1.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus brukes som en fellesbetegnelse på en gruppe metabolske sykdommer karakterisert med hyperglykemi, som skyldes defekter ved insulin sekresjon fra pankreas, mangel på effekt av insulin eller en kombinasjon av begge. WHO har klassifisert diabetes i to hovedformer: Insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM, type 1 diabetes) og ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM, type 2 diabetes). Type 1 diabetes (T1D) skyldes en absolutt mangel på insulinsekresjon fra pankreas [15]. Dette skyldes at kroppens immunsystem oppfatter de insulinproduserende cellene ( $\beta$ -cellene) i pankreas som fremmede og ødelegger dem. Årsakene til dette er ikke fullstendig kjent, men denne autoimmune reaksjonen skyldes trolig en kombinasjon av arv og ukjente miljøfaktorer som livsstil, kosthold, drikkevann eller virusinfeksjoner enten i fosterlivet eller i tidlig barndom. T1D oppstår i alle aldersgrupper, men er mest vanlig hos barn, ungdom og unge voksne [16]. T2D, som er den mest vanlige typen av diabetes, rammer stort sett personer over 40 år, men stadig yngre mennesker får også T2D. T2D skyldes en kombinasjon av resistens mot insulinvirkning (insulinresistens) og en utilstrekkelig kompenserende insulinsekresjon. I

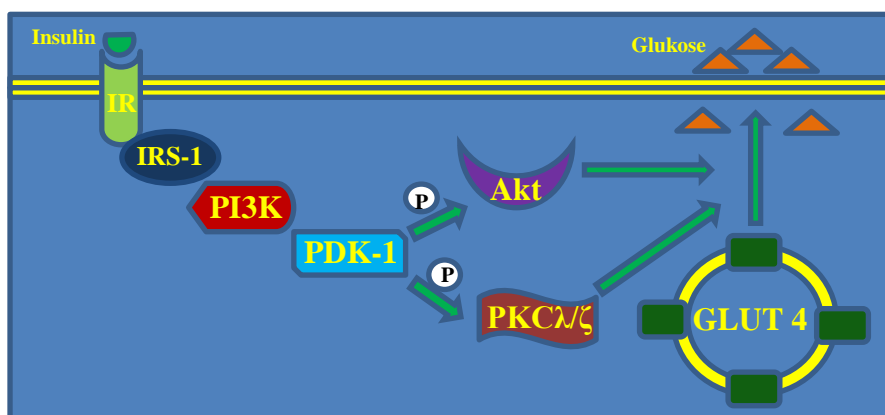
motsetning til T1-diabetikere, trenger få T2-diabetikere behandling med ekstra insulin [15, 16]. Ved T2D er det ikke uvanlig at pasienten kan gå lenge med hyperglykemi og få patologiske og funksjonelle endringer i målorganer før kliniske symptomer er tilstede og tilstanden er diagnostisert [15]. Den viktigste årsaken til T2D er insulinresistens som innebærer at cellene i muskler, fettvev og lever ikke reagerer som de skal på hormonet insulin. Det er disse tre organsystemene som er de viktigste for glukosebalansen i kroppen. Risikofaktorene for å utvikle T2D er arv, kosthold, for lite fysisk aktivitet, overvekt og fedme [16]. Kronisk hyperglykemi ved diabetes fører til langsiktige skader, dysfunksjon og svikt i flere organer, spesielt i øynene, nyrene, nervefibrene, hjerte og blodkar [15]. De langsiktige mikrovaskulære komplikasjoner av diabetes er blant annet diabetisk retinopati med potensielt synstap, diabetisk nefropati som fører til nyresvikt og diabetisk nevropati med økt risiko for diabetisk fotsår og amputasjoner. Blant de makrovaskulære komplikasjoner er aterosklerose og seksuell dysfunksjon [15, 17]. Insulinstimulert glukoseopptak er av den grunn livsviktig for postprandial reduksjon av blodsukkeret.

## **1.4 Insulinresistens i skjelettmuskel**

Insulin er viktig for regulering av glukosehomeostase og for vekst og utvikling av kroppens vev. Insulin frigjøres fra  $\beta$ -cellene i pankreas som en inaktiv enkeltkjedet forløper, preproinsulin, som spaltes videre til proinsulin. Når glukosenivå eller aminosyrekonsentrasjonen i blodet øker, frigjøres proinsulin som omdannes til aktiv insulin av spesielle proteaser. Hovedfunksjonen til insulin er regulering av glukosehomeostase ved stimulering av glukoseopptak i muskel- og fettceller, samtidig som den reduserer leverens glukoseproduksjon ved å inhibere glykogenolyse (omdannelse av glykogen til glukose) og glukoneogenese (oppbygning av glukose). I tillegg regulerer insulin fettmetabolismen ved å øke lipidsyntese i leveren og i fettceller samtidig som den hemmer lipolysen. Insulin er også viktig for opptak av aminosyrer i celler og for proteinsyntese [18].

Insulinstimulert glukoseopptak inni en insulinsensitiv muskelcelle skjer via translokasjon av glukose transportør type 4 (GLUT-4) i cellemembranen, ved at insulin binder seg til insulin reseptor (IR) på cellemembranen, som fører til aktivering av reseptorens tyrosinkinase. Den aktiverte tyrosinkinasen fosforylerer insulin reseptor substrat 1 (IRS-1) som så aktiverer fosfoinositid 3-kinase (PI3K). Aktivert PI3K aktiverer videre fosfoinositid-avhengig kinase 1 (PDK1). PDK1 fosforylerer og aktiverer både proteinkinase B (PKB/Akt) og den atypiske

proteinkinasen PKC  $\lambda/\zeta$  (aPKC). Akt og PKC  $\lambda/\zeta$  fremmer til slutt translokasjon av GLUT-4 i cellemembranen [19] (Figur 2).

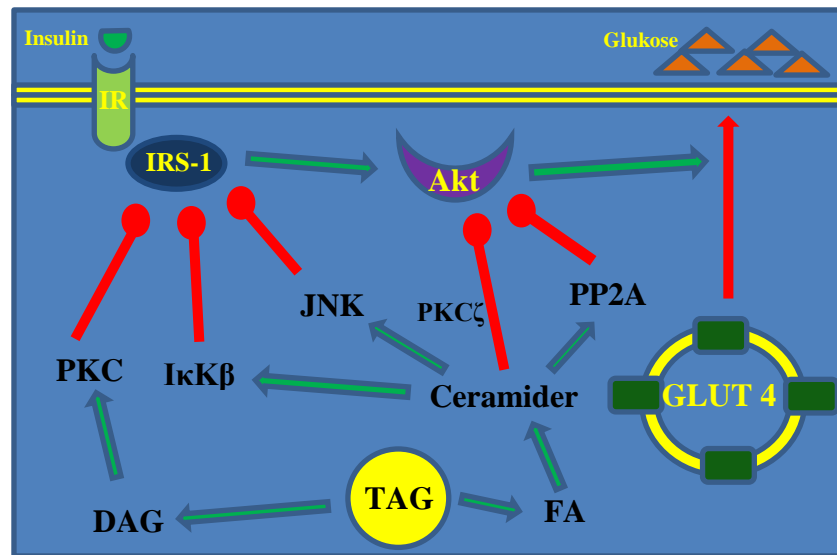


**Figur 2: Normal insulin signaleringskaskade som fører til GLUT-4 translokasjon.** Insulin binder seg til insulinreseptor (IR) i cellemembranen, som via en signaleringskaskade fremmer translokasjon av GLUT-4 i cellemembranen. Figuren er modifisert fra [19].

Insulinresistens i skjelettmuskel forekommer når normale mengder insulin ikke er tilstrekkelige for en normal insulinrespons i cellen, noe som er av stor betydning siden skjelettmuskel er det største vevet for insulinstimulert glukosefjerning fra blodet [20]. Overdreven lipidlagring i lipiddråper og vedvarende økt mengde sirkulerende lipider ved fedme nedsetter det hvite fettvevets kapasitet til å lagre lipider og beskytte celler mot lipotoksisitet [1, 21]. Dette fører til at overflødige fettsyrer akkumulerer i andre vev som lever og skjelettmuskel. I myocytter (muskelceller) akkumulerer fettsyrer intracellulært som fettacyl-CoA, monoacylglyserol (MAG), diacylglyserol (DAG), triacylglyserol (TAG) og ceramider. Denne unormale ektopiske lagringen av fettsyrer (lipotoksisitet) er sterkt assosiert med insulin resistens. Blant de nevnte fettsyrederivatene er intramyocellulær mengde av TAG, DAG og ceramider knyttet til aktivering av stresskinaser og er direkte assosiert med insulinresistens [21]. Selv om akkumulering av intramyocellulær triglydserid (IMTG) er assosiert med insulinresistens, er det uklart om IMTG forårsaker insulinresistens eller beskytter cellene mot den ved å hindre akkumulering av bioaktive lipidmetabolitter [20]. Insulinresistens i skjelettmuskel er karakterisert ved nedsatt glukoseopptak forårsaket av redusert insulinreseptorsignaleringskaskade. Det er vist nedsatt IRS-1 tyrosinfosorylering og redusert PI3K aktivitet hos personer med fedme og T2D. Reduksjonen i tyrosinfosorylering av IRS1 er knyttet til økt serin/treoninfosorylering av IRS-1. De antatte serin/treoninkinaser er inhibitor  $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IkK $\beta$ ), c-Jun N-terminal kinase (JNK), PKC-isoformer og mTOR. Dette resulterer i redusert mengde PI3K som igjen fører til redusert aktivitet av PKC  $\lambda/\zeta$  og



muligens Akt, som til slutt resulterer i nedsatt GLUT-4-translokering og dermed nedsatt glukoseopptak [20, 22]. De metabolske prosessene som knytter overproduksjon av fettsyrer til insulinresistens via aktivering av disse stresskinaser er ikke fullstendig klarlagt, men flere lipidmetabolitter er vist å være involvert [20] (Figur 3).



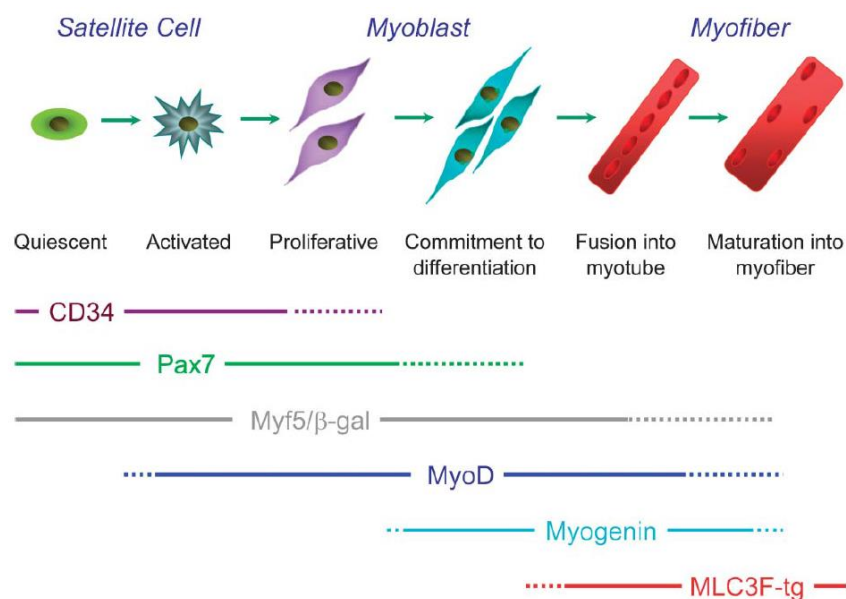
**Figur 3: Antatt mekanisme for fettsyremedierte insulinresistens i skjelettmuskel.** Fettsyrer som dannes fra nedbrytning av TAG kan brukes til nysyntese av ceramid. Ceramid aktiverer proteinfosfatase 2A (PP2A) som sammen med PKC $\zeta$  deaktiverer Akt og hindrer translokasjon av GLUT-4. Ceramid aktiverer også JNK og IKK $\beta$  som hindrer overføring av insulinsignal ved serinfosorylering av IRS-1. DAG fører til aktivering av flere proteinkinase C-isoformer (PKC) som kan stimulere serinfosorylering og dermed deaktivere IRS-1. Figuren er modifisert fra [19, 20].

## 1.5 Skjelettmuskulatur

Skjelettmuskulatur er nødvendig for bevegelse, respirasjon og balansering av kroppen [23]. Skjelettmuskel utgjør 40-50 % av den totale kroppsmassen, og er det vevet det finnes mest av i kroppen. På grunn av sin størrelse er skjelettmuskel et av de viktigste vevene for energiomsetning ved sitt glukose- og fettsyreopptak og oksidasjon. Hos mennesker bidrar den til ca. 80 % av kroppens totale insulinstimulert glukoseopptak [20]. Det finnes omtrent 600 separate muskler i kroppen og hver muskel består av muskelceller (myocytter/muskelfibre), bindevev, blodårer og nerver. Skjelettmuskelceller er store celler som dannes under fosterutvikling ved fusjonering av embryonale celler (myoblaster) til flerkjernede myotuber (differensiering). De utvokste muskelfibrene har en lengde som går fra få centimeter til omtrent 30 cm. Diameteren på en skjelettmuskel i en og samme person varierer og påvirkes av trening [24].

### 1.5.1 Myogenese og differensiering

Satelittceller er primære stamceller i skjelettmuskel som er ansvarlige for postnatal (etter fødsel) muskelvekst, muskelhypertrofi (unormal forstørrelse) og regenerering av muskelceller. I muskel er satelittceller de fremtredende stamcellene [25]. I voksen muskel ligger de fleste satelittceller i hviletilstand under muskelfibrenes basallamina, men de aktiveres og begynner å proliferere og differensiere til nye muskelfibrer ved skade [25, 26] og migrerer til skadestedet [23]. Etter aktivering går en andel av de aktiverte satelittcellene tilbake til hviletilstand under prosessen av selvfornyelse, som gjør at antall satelittceller i voksen muskel holder seg relativt konstant, slik at det finns en tilstrekkelig reserve for fremtidige behov [25]. Resten av de aktiverte satelittcellene deler seg og danner myoblaster som prolifererer (formerer) før de går inn i differensieringsfasen og fusjonerer (smelter sammen) for å danne flerkjernede myotuber som så vokser til myofibrer [27] (Figur 4).

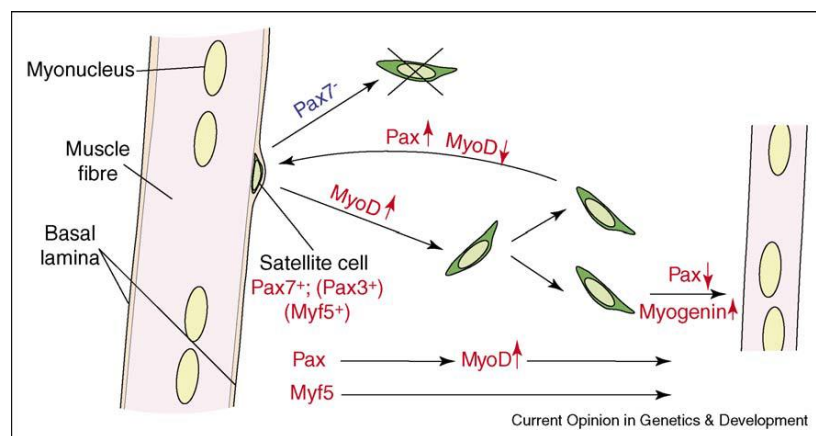


**Figur 4: Skjematiske illustrasjon av satelittcellemyogenese og de typiske genetiske markørene under hvert trinn.** Under hviletilstanden er genene CD34, Pax7 og Myf5/b-gal uttrykt i satelittceller. Når satelittceller aktiveres, starter de raskt MyoD-uttrykk, mens myogenin markerer senere oppføringen i differensieringsfasen. Det temporale uttrykksmønsteret av MLC3F-tg er typisk av mange strukturelle muskelgener som skjelettmuskelaktin og MyhC. Figuren er hentet fra [27].

Under vekstbetingelser fortsetter myoblaster å proliferere og uttrykker ikke differensieringsmarkører. Når vekstfaktor fjernes, går de ut av cellesyklusen og induserer uttrykk av myogenin (MYOG), som er en differensieringsmarkør, asynkront og irreversibelt [28].

Dannelse av skjelettmuskel er avhengig av myogeniske regulatoriske faktorer, slik som MyoD, Myf5, Mrf 4 og MYOG. MyoD og Myf5/Mrf4 bestemmer skjelettmuskelens skjebne,

mens myogenin samt MyoD og Mrf4 styrer differensieringen. Ved starten av myogenese virker PAX-proteinene, Pax3 og Pax7, oppregulerende for Myf5 og MyoD og kontrollerer oppføring av celler i myogenisk syklus [26]. Uttrykk av Pax7 merker satelittcellene. Pax 3 finns også i mange muskelceller, men ikke i alle. Den har viktige funksjoner prenatalt (før fødsel) og nedregulering av Pax3-uttrykk starter før fødselen. Under postnatal vekst og ved skade, når satelittceller er aktivert og starter proliferering, øker uttrykk av Pax- og MyoD-gener. Differensiering av satelittceller til fibrer er karakterisert ved nedregulering av Pax-gener og uttrykk av myogenin som er viktig for differensiering. Satelittceller som bevarer Pax-uttrykk går tilbake til hviletilstanden med samtidig nedregulering av MyoD (Figur 5). Fortsettelse av Pax-uttrykk er ikke uvanlig ved myogenese, men overuttrykk av den er ikke vanlig. Uttrykk av MyoD avhenger av Pax3 og Pax7, mens uttrykk av Myf5, som allerede er uttrykt i rolige satelittceller, er uavhengig av Pax-proteiner og kan fremme differensiering av muskelcellen ved fravær av MyoD [29].



**Figur 5: Myogenese og differensiering av satelittceller.** Under postnatal vekst og muskelregenerasjon, forlater satelittceller lokalisert under muskelfibrenes basallamina nisjen, aktiveres, prolifererer og enten differensierer til nye fibrer eller går tilbake til satelittcelletilstanden. Denne prosessen reguleres av Pax-proteiner og de myogeniske faktorene illustrert over. Ved fravær av Pax7 vil satelittceller dø. Figuren er hentet fra [29].

Mef2 transkripsjonsfaktorer er viktige regulatorer av muskeldifferensiering og de er også vist å ha betydning for fibertypeprofil. Det finns fire MEF2-gener: MEF2a-, -2b, -2c og -2d.

Proteinmengden i MEF2a, MEF2c, og MEF2d er like i rask og langsom muskel. Det er vist at mengde type I muskelfibrer er redusert hos MEF2c- og MEF2d-knockout mus, men ikke MEF2a. MEF2-aktivitet forsterkes sterkt av kalsinevrin [30]. Først etter at muskelen er fullstendig utviklet, forblir antall muskelceller nesten konstant og, med få unntak, muskelvekst eller muskeltap skjer kun via muskelhypertrofi (muskelforstørrelse) eller muskelatrofi (muskelsvinn) av eksisterende muskelceller. I tillegg syns fibertypesammensetningen, det vil si antall fibrer av type I, IIa og IIb, å være bestemt

genetisk, selv om det fynogenetiske uttrykket av muskelproteiner styres av type og antall kontraktile aktivitet [31].

### **1.5.2 Oppbygning av skjelettmuskulatur**

Hver muskelfiber er omgitt av en tynn bindevevshinne. Bunter av muskelfibrer ligger innpakket i tykkere hinne og selve muskelen er dannet av mange slike grupper omgitt av enda tykkere bindevevshinne. Det finns kollagenfibre ekstracellulært i alle disse hinnene som går direkte over til sener ved musklens ender og holder fibre koblet til sener. I tillegg ligger det nerver og nett av kapillærer i bindevevshinnen som forsyner fibre med oksygen til energiomsetning ved aktiv sirkulasjon. Skjelettmuskulaturen betegnes som tverrstripet muskulatur for de har et repeterende mønster av lyse og mørke bånd på tvers av fibre. Det indre av muskelfibre er tettpakket med myofibriller, som går gjennom hele muskelfiberen fra den ene enden til den andre og utgjør ca. 80 % av muskelfibrenes masse. Myofibriller består hovedsakelig av to typer myofilamenter. Myofilamenter er tynne tråder som er bygd opp av proteinene aktin og myosin. Myosinfilamenter er dobbelt så tykke som aktinfilamenter [24, 32]. Aktin og myosin er de mest tallrike proteinene i kroppen hos pattedyr og utgjør ca. 65 % av det totale muskelproteininnholdet [31].

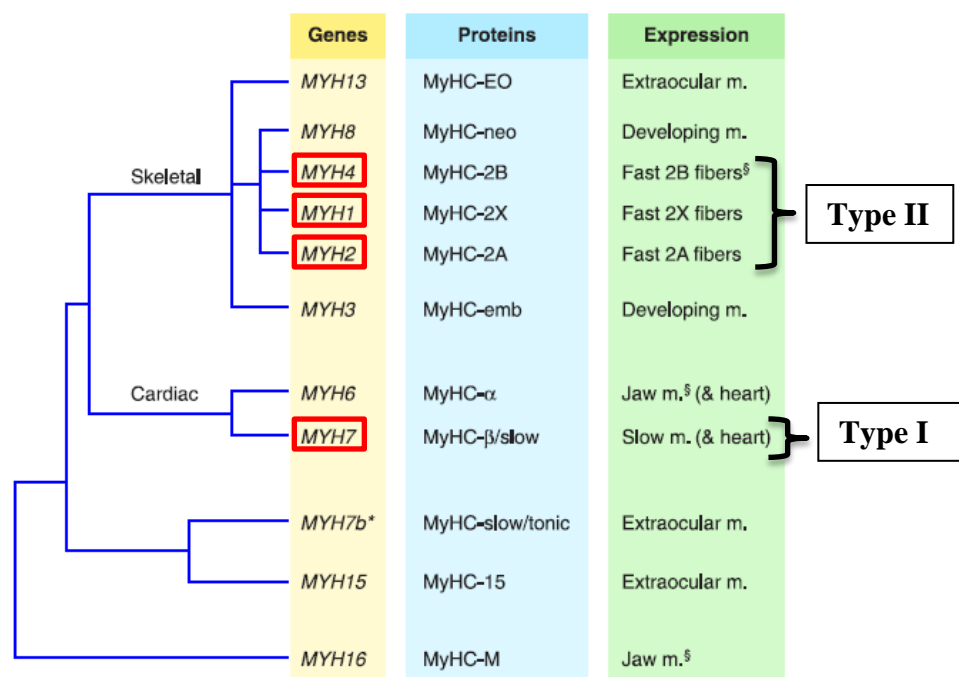
### **1.5.3 Muskelfibertyper**

Muskelfibrer fra forskjellige motoriske enheter er forskjellige med hensyn til hvor raskt myosin kan spalte ATP og dermed hvor raskt muskelfibre kan trekke seg sammen. Grunnen til denne variasjonen er at myosin har flere forskjellige isoformer med ulike ATP-ase aktivitet. Basert på kontraksjonshastigheten for enkeltkontraksjoner deles fibre i to hovedtyper: langsomme (type I) og raske (type II) muskelfibrer. Differensiering til ulike fibertyper skyldes både kjemiske signaler fra de motoriske nervefibre som danner synapser med muskelcellene og impuls mønsteret i disse nervefibre [24, 32].

En annen faktor som skiller mellom ulike muskelfibrer er i hvilken grad de er spesialisert for henholdsvis aerob (oksygenavhengig) og anaerob (oksygenuavhengig) produksjon av ATP. De fibre som hovedsakelig danner ATP ved oksidativ fosforylering, kalles oksidative fibrer, mens de som i korte perioder er i stand til å dekke sitt ATP-behov ved glykolyse, kalles for glykolytiske fibrer. Denne forskjellen skyldes konsentrasjonsforholdet mellom oksidative og glykolytiske enzymer i cellen. Type II fibre deles derfor inn i to undergrupper: Raske oksidative fibrer (type IIa/2A) og raske glykolytiske fibrer (type

Iib/2B). De langsomme type I-fibrene er oksidative og kalles for langsomme oksidative fibrer. De langsomme fibre tilhører små motoriske enheter og rekrutteres ved svake muskelkontraksjoner. Aktiviteten til disse dominerer ved moderate arbeid. De raske glykolytiske fibre utfører tyngre motoriske arbeid, som er blant de siste som rekrutteres ved økende muskelkraft, og aktiviteten til disse fibre dominerer ved kraftig, kortvarig arbeid. De raske oksidative fibre inntar en mellomstilling med hensyn til størrelsen av det motoriske arbeidet [24, 32].

En tredje type rask fibertype (type II) med myosin tung kjede (MyHC)-sammensetning ulik Iia- og Iib-fibrer, type Iix (2X) og type Iid (2D), ble funnet opp rundt 1988-1994. Den sentrale rollen til myosin som molekylærmotor i muskelcellefysiologi og eksistens av flere MyHC isoformer, som er fordelt ulikt i ulike fibrer, gjør MyHC den beste markøren for muskelfiberklassifisering. Motoriske enheter som består av type Iix fibrer har kontraksjonshastighet som er midt i mellom Iia- og Iib-enhetene [30] (Figur 6).

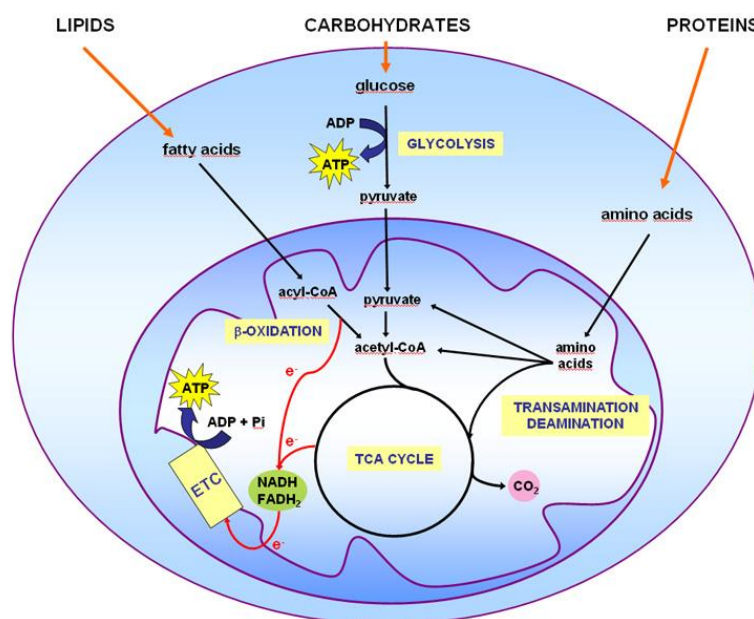


**Figur 6: Oversikt over sarkomeriske MYH-gener hos pattedyr med de tilsvarende proteinproduktene og ekspresjonsmønstre.** EO: ekstraokulær muskel; neo: neonatal; emb: embryonal; m.: muskulatur. Figuren er hentet og modifisert fra [30].

Studier viser en sammenheng mellom muskelfibertype og metabolske sykdommer. Blant annet er insulin-stimulert glukoseopptak vist å være større i skjelettmuskel beriket med langsomme muskelfibrer (type I) [33]. Det er også vist en høyere fettsyreoksidativ enzymaktivitet i type I muskelfibrer i forhold til type Iia som igjen har høyere oksidativ enzymaktivitet enn type Iib, men innenfor hver fibertype, skjelettmuskel fra magre individer hadde høyere oksidativ enzymaktivitet enn individer med fedme og T2D [34].

### 1.5.4 Generell energimetabolisme i skjelettmuskelfibrer

Næringsstoffer som skal benyttes i muskelceller må først brytes ned til enkle byggesteiner før de kan tas opp eller brukes av muskelceller enten som energikilde eller byggesteiner for andre molekyler. Næringsstoffene består hovedsakelig av lipider (triglyserider, fosfolipider og steroider), karbohydrater (polysakkarider), og proteiner. Lipider brytes ned til glyserol og frie fettsyrer, karbohydrater brytes ned til glukose, og proteiner brytes ned til aminosyrer før de kan tas opp i cellen [24, 35]. Det er fettsyrer og glukose som er de viktigste substratene for ATP-produksjon. ATP dannes i mitokondrier ved oksidativ fosforylering av ADP, en prosess som krever tilførsel av oksygen fra blodet [24] (Figur 7).



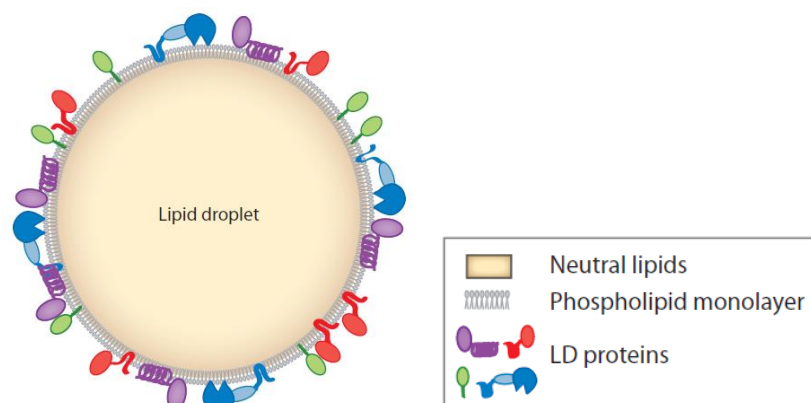
**Figur 7: Skjematisk illustrasjon av drivstoffmolekylene inngåelse i oksidativ metabolisme i mitokondrier.** Lipider, proteiner og karbohydrater brytes ned til fettsyrer, aminosyrer og pyruvat tilsvarende. Disse molekylene inngår i trikarboksylsyre (TCA)-syklus/sitronsyresyklus i mitokondrier for å bli fullstendig oksidert til karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ), med samtidig reduksjon av  $\text{NAD}^+$  og  $\text{FAD}$  til  $\text{NADH}$  og  $\text{FADH}_2$  tilsvarende. Elektroner overføres fra reduserte koenzymer til  $\text{O}_2$  i elektrontransportkjeden (ETC) som fører til ATP-syntese.  $\text{NADH}$ , redusert form av koenzymet nikotinamidadenindinukleotid;  $\text{FADH}_2$ , redusert form av koenzymet flavinadenindinukleotid. Figuren er hentet fra [36].

## 1.6 Lipidråper

Lipidråper (LDER) er dynamiske cytoplasmaorganeller som finns utbredt i celler og utgjør en hydrofob fase i vandig cytosol. LDER er involvert i mange cellulære funksjoner som lipid lagring for energiproduksjon og membransyntese, viral replikasjon, og protein- lagring og degradering. Disse prosessene er knyttet til en rekke fysiologiske og patologiske tilstander som fedme og relaterte metabolske sykdommer. Nærmest alle typer celler har eller kan lage lipidråper. Mange eukaryote celler har noe LDER, og dyrking av celler med fettsyrer (FA) stimulerer LD-dannelse. Adipocytter (fettceller) har mange LDER på grunn av aktiv lipid syntese og lagring [1].

### 1.6.1 Oppbygning av lipidråper

En lipidråpe består av en hydrofob kjerne med nøytrale lipider som lagrer metabolsk energi og membrankomponenter og virker som senter for lipidmetabolisme. Denne hydrofobe kjernen er skilt fra den vandige cytosolen med et enkelt lag av overflatefosfolipider. Det finns en gruppe proteiner på fosfolipidlaget til LDER, perilipiner, som spesifikt lokaliserer på overflaten av LDER (Figur 8). Strukturelt sett ligner LDER derfor på plasma lipoproteiner, men LDER er vanligvis mye større enn lipoproteiner. Størrelsen og antall LDER varierer mye fra celle til celle og mellom ulike individer (fra 0,10 - 100  $\mu\text{m}$ ). De fleste celler har små LDER mens LDER i hvite fettceller fyller opp nesten hele cellevolumet. LD-størrelse kan forandre raskt. LDER vokser også raskt under adipogenese (differensiering av preadipocytter til adipocytter) mens de krymper i løpet av timer når celler blir dyrket med begrensede næringsstoffer [1].



**Figur 8: Forenklet skjematisk struktur av lipidråper.** Kjernen av lipidråper består av nøytrale lipider [hovedsakelig sterylester (SE) og triglyserider (TG)] som er omkranset av et enkelt fosfolipidlag [hovedsakelig fosfatidylkolin (PC) og fosfatidyletanolamin (PE)] og overflateproteiner [perilipiner (PLINer)]. Figuren er hentet fra [1].

### 1.6.2 Den nøytrale kjernen

De primære nøytrale lipidene i LD kjernen er sterol estere (SE) og triglyserider (TG). Det relative forholdet mellom disse varierer mellom celletyper. LDer av fettceller inneholder primært TG, mens av makrofage skumceller inneholder stort sett SE. Syntese av de nøytrale lipidene katalyseres av flere ulike enzymer. Hos pattedyr, acyl-koenzym A (Acyl-CoA):diacylglycerol acyltransferase enzymer DGAT1 og DGAT2 katalyserer hovedsakelig syntese av TG, mens acyl-coenzym A (Acyl-CoA):kolesterol acyltransferase enzymer ACAT1 og ACAT2 katalyserer hovedsakelig syntese av SE. Disse nøytrallipid syntetiserende enzymer er lokalisert primært i endoplasmatiske retikulum (ER). Unntaket er DGAT2 som også lokaliserer på LDer [1, 37].

### 1.6.3 Fosfolipid monolaget

Overflaten til LDer består av polare, amfipatiske lipider. I pattedyrs LDer, fosfatidylkolin (PC) er hoved overflatefosfolipidet, etterfulgt av fosfatidyletanolamin (PE) og fosfatidylinositol. PC er viktig i emulgering av LDer. Overflaten til LDer inneholder også andre polare lipider som steroler og den relative mengden av disse lipidene avhenger av celletype [1].

### 1.6.4 Lipidråpeassosierte proteiner

Lipidråper er dekorert med flere typer proteiner på overflaten. Disse inkluderer strukturelle proteiner (for eksempel proteiner av PAT-familien), lipidsyntetiserende enzymer [for eksempel acetyl koenzym A (CoA)-karboksylase, acyl-CoA syntetase og acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2)], lipaser [for eksempel fettvevstriglyseridlipase (ATGL)] og membran transportproteiner (for eksempel Rab5, Rab18 og ARF1). Ulike LDer i en celle kan inneholde ulike av disse proteinene og det er ikke kjent hvordan denne lokaliseringen er regulert [37].

Lipidråpeassosierte proteiner i PAT-familien (perilipiner) består av de fem medlemmene: PERILIPIN (PLIN1), ADRP (PLIN2), TIP47 (PLIN3), S3-12 (PLIN4) og LSDP5 (PLIN5) [38]. PLIN1 uttrykk er begrenset til fettvev, hvor den spiller en viktig rolle i lagring og degradering av LDer [39]. PLIN1 har flere varianter (a, b, c, og d). Kjernene til PLIN1a, PLIN1b og av PLIN5 består hovedsakelig av TAG, mens kjernene til PLIN1c og PLIN4 består hovedsakelig av CE. Mekanismene bak en slik preferanse er uklare [37, 40].



PLIN2 uttrykkes i flere vev som skjelettmuskel, lever og tynntarm. PLIN2 i skjelettmuskel er viktig for lagring av intramyocellulære lipider (IMCL), men interessant nok har studier vist at genuttrykk av PLIN2 var lavere i pasienter med T2D i forhold til kontrollpasienter med fedme. Det er også vist at vekttap som resulterer i redusert IMCL fører samtidig til økning i mengde PLIN2 i muskelceller parallelt med forbedret insulinsensitivitet. PLIN2 kan derfor være med på å beskytte mot lipotoksisitet ved effektiv lagring av IMCL i form av TG og gi økt insulinsensitivitet [39].

### **1.6.5 Funksjon av lipiddråper i celler**

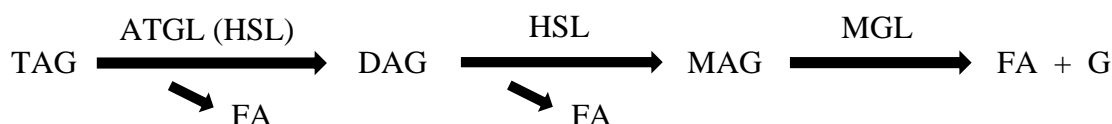
LDer har mange funksjoner i celler. De fungerer først og fremst som intracellulære fettlager, som lager byggesteiner til membraner og danner substrater for energiomsetningen. LDer fungerer også som organiserende sentre for syntetisering av spesifikke lipider. TG, for eksempel, som syntetiseres i endoplasmatisk retikulum (ER), syntetiseres også på LDer. I tillegg kan LDer også lagre proteiner midlertidig når mengden av disse proteinene er høy i cellen [1, 41]. Selv om både LDer og lipoproteiner dannes ved nøytral lipid syntese på ER, er de fysiologiske funksjonene av dem annerledes. LDer fungerer primært som lipidlagre mens lipoproteiner fungerer som lipid- transportører og distributører i kroppen [1].

### **1.6.6 Dannelse av lipiddråper**

Mange organeller replikerer seg selv, men LDer dannes sannsynligvis de novo (fra starten). I eukaryoter kan LDer dannes først og fremst på ER, hvor enzymer som syntetiserer nøytrale lipider sitter. Mekanismen for hvordan LDer dannes og hvordan et enkelt fosfolipidlag dannes fra en to-lags membran er ikke helt avklart, men en antatt mekanisme er avsnøring (budding) fra ER etter å ha omkranset nøytrale lipider som er blitt syntetisert og akkumulert i fosfolipid bilaget på ER. De forblir så enten koblet til ER eller knopper av [1, 37].

## 1.7 Lipolyse i skjelettmuskelceller kontra fettceller

Ved lipolyse brytes lipider ned til frie fettsyrer (FFA) ved hydrolyse [1] (Figur 9).

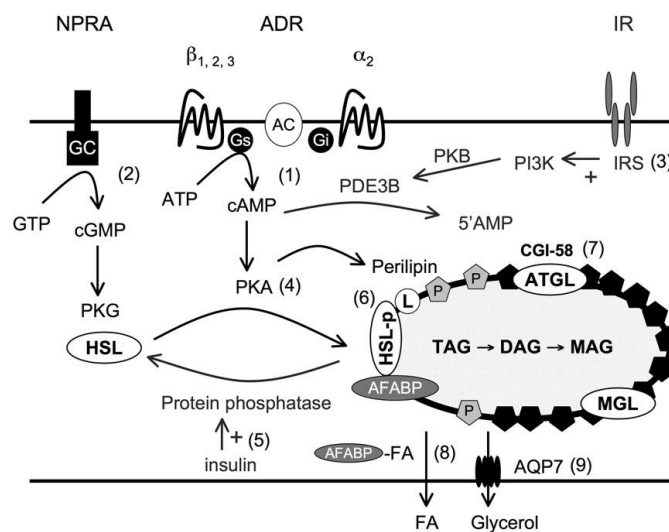


**Figur 9: Nedbrytning av triglyserider til fettsyrer ved lipolyse.** Ved lipolyse hydrolyseres den første estergruppen av TAG hovedsakelig av ATGL (i mindre grad også av HSL), som fører til dannelse av DAG. DAG hydrolyseres videre til MAG av HSL. Til slutt er MGL viktig for en fullstendig hydrolyse av MAG til FA og G. TAG, triglyserider; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol; FA, fettsyrer; G, glyserol; ATGL, fettvevstriglyseridlipase; HSL, hormonsensitiv lipase; MGL, monoacylglycerol lipase. Figuren er modifisert fra [42].

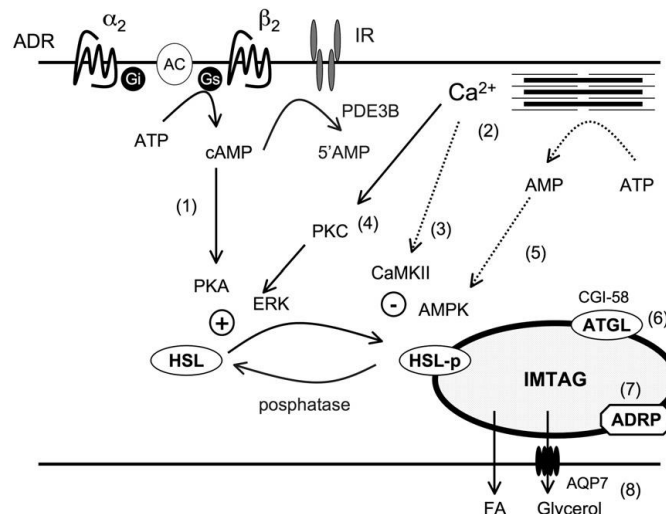
Celler som lagrer TAG bruker lipolyse til å lage energi og membranlipider. Lipiddråper krymper under lipolyse og deres overflateareal avtar på grunn av katabolisme av kjernelipider. I flercellede organismer lagres energi hovedsakelig i fettvev og mest kunnskap om lipolyse kommer fra fettvev [1]. Lipolyse kan skje både ekstracellulært, som medieres av lipoproteinlipase (LPL), eller intracellulært [42]. Det er en prosess hvor fettceller i kroppen degraderer og frigjør sitt innhold av fettsyrer fra fettlageret som triglyserider (TAG). Dette skjer ved økt energi behov i kroppen som ved faste eller akutt stress. Lipolyse ved langvarig faste utløses på grunn av økt behov for fettsyrer for å dekke kroppens energibehov eller ved lave verdier av sirkulerende insulin eller katekolaminer. Lipolyse ved akutt stress er derimot intens og kortvarig, og utløses av katekolaminer (adrenalin og noradrenalin). Det er et klart skille mellom «basal» lipolyse og lipolyse utløst av hormoner og andre stoffer. Fettsyrer produseres og frigjøres i tre hovedorganer: Hvitt fettvev (WAT), tarmen og leveren. Tarmen og leveren forestrer fettsyrer før frigjøring som TAG pakket inn i lipoproteinpartikler (VLDL fra leveren og kylomikroner fra tarmen) [43, 44]. Adipocytter (fettceller) frigjør ikke-forestrede (frie) fettsyrer (FFA). Egentlig er begrepet «frie fettsyrer» litt misvisende, fordi langkjedede fettsyrer (LCFAs), som er cytotoksiske, er bundet til proteiner som albumin i sirkulasjonen og til fettsyrebindende proteiner (FABP) når de er inni cellen. Fettsyrer er de største drivstoffene for energiproduksjon i muskelceller, hjerte, nyrer og lever. Minst to adipocyttilipaser er viktige for regulering av lipolyse og de er fettvevstriglyseridlipase (ATGL) og hormonsensitiv lipase (HSL). ATGL har en N-terminal domene som interagerer med komparativ genidentifikasjon-58 (CGI-58), som er et annet lipiddråpeassosiert protein og er ATGL-aktivator. Aktiveringsmekanismen er uklar, men den krever interaksjon av både

proteiner og CGI-58 med LDer. Perilipin (PLIN1) og muligens andre lipiddråpeproteiner er hovedregulatorer av lipolyse ved enten å beskytte mot eller eksponere triglyseridkjernen av lipiddråpen for lipaser. Det er interaksjonen mellom ATGL og perilipin1 som regulerer lipolyse [1, 44].

Omtrent 90 % av kroppens fett finns i fettvev. I tillegg er en liten mengde fett også lagret i muskel, lever og i bukspyttkjertelen (ektopisk fett). Det finns fortsatt begrenset kjennskap om regulering av lipolyse av intramyocellulær triglydserid (IMTG), men det er vist både HSL og ATGL ekspresjon i skjelettmuskel. I humane adipocytter (fettceller) er katekolaminer og insulin de viktigste hormonene som regulerer lipolyse. I tillegg viser nyere studier at natriuretiske peptider (NP) kan også ha en lypolytisk effekt hos mennesker, noe som kan induseres når  $\beta$ -adrenerge reseptorer er blokkert. I myocytter (muskelceller) derimot har kun  $\beta_2$ -subtypen av adrenerge reseptorer betydning for regulering av katekolamin-indusert lipolyse [42]. Figurene nedenfor viser skjematiske illustrasjoner av lipolyse-signaleringsveier i adipocytter (Figur 10) og i myocytter (Figur 11):



**Figur 10: Lipolyse-signaleringsvei i adipocytter.** (1) Katekolaminer virker på adrenerge reseptorer (ADR) som enten stimulerer adenylatsyklase (AC) ved hjelp av stimulerende G-proteiner (Gs), eller hemmer AC ved hjelp av hemmende G-proteiner (Gi). (2) Atriale natriuretiske peptider virker på guanylylsyklase (GC) som er koblet til natriuretisk peptid reseptortype A (NPRA). Den påfølgende økningen i syklisk guanylatmonofosfat (cGMP) og aktivering av proteinkinase G (PKG) induserer fosforylering av HSL. (3) Binding av insulin til insulinreseptor (IR) fører til aktivering av insulinreseptorsubstrat (IRS) som videre aktiverer PI3K. Aktivert PI3K fører til fosforylering av fosfodiesterase 3B (PDE3B) ved hjelp av proteinkinase B (PKB). PDE3B omdanner så syklisk adenosinmonofosfat (cAMP), som er dannet av AC, til 5'AMP, som forhindrer PKA-aktivering og minker dermed lipolyse. (4) cAMP, som er dannet av AC, aktiverer PKA som så fosforylerer og aktiverer minst to substrater: HSL og perilipin (P). Fosforylering av HSL og perilipin fører til translokasjon av HSL fra cytosol til lipiddråpeoverflaten. (5) Insulin kan også aktivere proteinfosfataser med påfølgende defosforylering av HSL. (6) Det skjer en interaksjon mellom fosforylert HSL (HSL-p) og lipotransin (L) på lipiddråpeoverflaten. (7) Istedenfor fosforylering og translokasjon, et ATGL-aktivatorprotein kalt komparativ genidentifikasjon-58 (CGI-58) aktiverer ATGL. (8) Interaksjonen mellom HSL og adipocytt fettsyrebindende protein (AFABP) favoriserer en rask diffusjon av FA til sirkulasjonen via passiv diffusjon. (9) Glycerolfrigjøring fra adipocytter er mediert av akvaporin 7 (AQP7). Figuren er hentet fra [42].

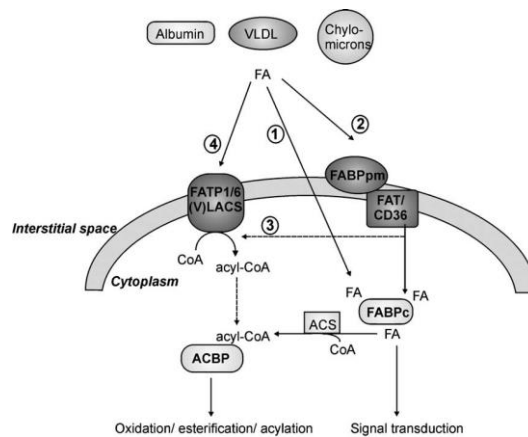


**Figur 11: Lipolyse-signaleringsvei i myocytter.** Katekolaminer og muskelkontraksjon kan fosforylere og aktivere HSL. (1) Effekten av HSL-aktivert av katekolaminer medieres av ADR som aktiviserer PKA. (2) Under muskelkontraksjon øker den intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjonen, noe som fosforylerer HSL via aktivert av to kinaser (PKC og ERK). (3) Kalsium/kalmodulin-avhengig kinase II (CaMKII) hemmer HSL aktivitet. (4) PKC fosforylerer og aktiviserer HSL via den ekstracellulære signalregulerte proteinkinase (ERK)-signaleringsveien. (5) Muskelkontraksjon øker aktiviteten av adenosin monofosfataktivert proteinkinase (AMPK) som fører til økt HSL-fosforylering men ikke økt HSL-aktivitet. (6) I tillegg til HSL kan også ATGL og dens kofaktor CGI-58 ha betydning for lipolyse i adipocytter. (7) I motsetning til adipocytter er perilipin (PLIN1) ikke uttrykt i myocytter. Det dominerende lipiddråpeassosierte proteinet i skjelettmuskel er ADRP (PLIN2). (8) AQP7 er også uttrykt i skjelettmuskel og kan mediere glyserolfrigjøringen fra skjelettmuskel. Figuren er hentet fra [42].

FFA frigjort fra TG i LDer kan enten bli forestret på nytt av DGAT eller monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) og omgjort til TG, brukt for  $\beta$ -oksidasjon for å lage energi, brukt som byggestein for membranlipidsyntese, brukt som kofaktor for celledsignalerings eller bli eksportert [1, 37]. In vivo og in vitro studier hos personer med fedme har vist en forekomst av katekolamin resistens i fettvev som er begrenset til  $\beta_2$ -adrenerge reseptorer. Studier viser også nedsatt katekolamin-indusert lipolyse i skjelettmuskel hos personer med fedme [42].

### 1.7.1 Fettsyre- opptak og metabolisme i skjelettmuskelfibrer

Fettsyrer (FA) som hovedsakelig frigjøres fra fettvev til blodet ved lipolyse av TAG, binder seg til albumin i blodet for å kunne fraktes. Frie fettsyrer (FFA) tas deretter opp i muskelceller etter å ha dissosiert fra albumin i blodet. Opptaket skjer enten via passiv diffusjon eller via fettsyretransportproteiner. Tre typer transportproteiner er identifisert som står for transport av FFA inni cellen: Plasmamembranassosiert fettsyrebindende protein (FABPpm) på ytre delen av membranen, fettsyretransportproteiner 1-6 (FATP1-6) med minst 6 transmembrane domener og fettsyretranslokase (FAT/CD36) som har minst 2 transmembrane domener [45, 46] (Figur 12).



**Figur 12: Skjematisk bilde av fettsyreopptak i muskelceller.** I tillegg til passiv diffusjon (1), kan interaksjonen mellom FAT/CD36 og FABPpm (2) akselerere dissosiering av FFA fra albumin. FAT/CD36 kan også interagere med FATP for påfølgende opptak av FFA (3). Alternativt kan FATP overføre FFA direkte via cellemembranen (4). Figuren er hentet fra [45].

Etter at FFA er tatt opp i cellen, forblir de vannuløselige og binder seg enten til intracellulære fettsyrebindende proteiner (FABPc) eller til Acyl-CoA-bindende protein (ACBP) [46].

Deretter forestres FFA til langkjedet acyl-CoA ved acyl-CoA syntetase (ACS). Her blir en liten del av acylgruppene på langkjedet acyl-CoA omdannet til intracellulære lipider som TAG, DAG, fosfolipider og ceramid, mens det meste av acylgruppene fraktes til mitokondrier for oksidasjon. En redusert FA oksidasjon i mitokondrier fører til økt IMTG-akkumulering [47]. Ved muskelkontraksjon øker FAT/CD36 på cellemembranen.

Muskelkontraksjon fører også til translokasjon av FABPpm i cellemembranen. De eksakte mekanismene bak translokasjonen av disse proteinene er fortsatt ukjent men studier viser at insulin kan indusere FAT/CD36-translokasjon, en prosess som muligens involverer PI3K-signalering [46]. Studier har også vist at trening hos unge kvinner øker antall mitokondrier og FABPpm på cellemembranen og antall FAT/CD36 på mitokondriemembran i muskelceller [48].

## 1.7.2 Opptak av fettsyrer i mitokondrier

Transport av acylgrupper av langkjedet acyl-CoA inn til mitokondrier tilrettelegges av en karnitin-avhengig transport system som består av karnitinpalmitoyl transferase-1 og -2 (CPT-1 og CPT-2) og karnitin translokase (CAT). CPT-1, som ligger på utsiden av mitokondriemembranen, er det hastighetsbestemmende enzymet for mitokondriell opptak av FA. Den katalyserer reaksjonen som omdanner langkjedet acyl-CoA og karnitin til acylkarnitin, som fraktes gjennom den indre membranen via CAT. Her blir acylkarnitin omgjort til langkjedet acyl-CoA og karnitin via CPT-2. Langkjedet acyl-CoA kan da inngå i  $\beta$ -oksidasjon [47].

## 1.8 Opptak og metabolisme av proteiner og aminosyrer i skjelettmuskelceller

### 1.8.1 Aminosyrer

Aminosyrer er organiske forbindelser som er byggesteinene i proteiner. De består av en basisk aminogruppe ( $-NH_2$ ), en karboksylsyregruppe ( $-COOH$ ) og en organisk sidekjede (karbonkjede) som er unik for hver aminosyre. Det finns mer enn 100 naturlig forekommende aminosyrer, men av disse er det bare 20 aminosyrer som utgjør byggesteiner i proteiner.

Disse er alle  $\alpha$ -aminosyrer, hvor aminogruppen sitter på karbonatomet nærmest karboksylgruppen. 12 av disse aminosyrene kan syntetiseres i menneskekroppen ved en biokjemisk prosess som kalles transaminering. De resterende 8 klarer ikke menneskekroppen lage selv, de må derfor tilføres gjennom kosten og disse kalles «essensielle aminosyrer». De essensielle aminosyrene er: Metionin (Met), leucin (Leu), treonin (Thr), lysin (Lys), isoleucin (Ile), valin (Val), fenylalanin (Phe) og tryptofan (Trp). I tillegg er histidin (His) en essensiell aminosyre hos barn. Aminosyrene bindes sammen med kovalente peptidbindinger til lange kjeder og danner proteiner. Alle aminosyrer kan eksistere i både L og S-form, men bare L-formen av de to isomere formene av aminosyrer finnes i proteiner. Med unntak av glysin, er alle optisk aktive. Aminosyrenes sidegrupper kan deles i ikke-polare (uladede/nøytrale) og polare (ladede/ioniske) grupper [49].

De 20 aminosyrene kan settes sammen i uendelig forskjellige kombinasjoner og danne de utallige forskjellige proteinene som finns. Disse 20 aminosyrene kan deles inn i disse 6 hovedgruppene:

1. Alifatiske (med åpen karbonkjede) aminosyrer med en aminogruppe og en karboksylsyre-gruppe: Glysin (Gly), alanin (Ala), valin (Val), isoleucin (Ile), serin (Ser) og threonin (Thr).
2. Svovelholdige aminosyrer: Cystein (Cys) og metionin (Met).
3. Alifatiske aminosyrer med to karboksylsyregrupper: Asparaginsyre (Asp), glutaminsyre (Glu), asparagin (Asn) og glutamin (Gln).
4. Alifatiske basiske aminosyrer: Lysin (Lys), arginin (Arg) og histidin (His).
5. Aromatiske (med ringstruktur) aminosyrer: Fenylalanin (Phe) og tyrosin (Tyr).
6. Heterosykliske aminosyrer: Tryptofan (Trp) og prolin (Pro) [49].

## 1.8.2 Proteiner og aminosyrer i skjelettmuskelceller

Muskler inneholder 40 % av kroppens totale proteininnhold og står for mellom 1/3 til 1/2 del av kroppens proteinomsetning [31]. De er kroppens største reservoarer for frie aminosyrer og ved tilstander som utsulting og katabolske sykdommer frigjøres aminosyrer fra muskler til blodsirkulasjonen for å benyttes i andre vev i kroppen. Derimot kan sirkulerende aminosyrer tas opp aktivt av muskler når proteinanabolisme trengs i muskelcellen. Derfor kan transmembrane transportsystemer spille en viktig rolle for regulering av proteinutveksling i muskelceller [50]. Det er vist at i tillegg til humorale og nevralt faktorer, har forandringer i aminosyretilgjengelighet også alvorlige konsekvenser for flere celledfunksjoner som regulering av signaleringsveier og genuttrykk, samt transport og metabolisme av selve aminosyrene [51].

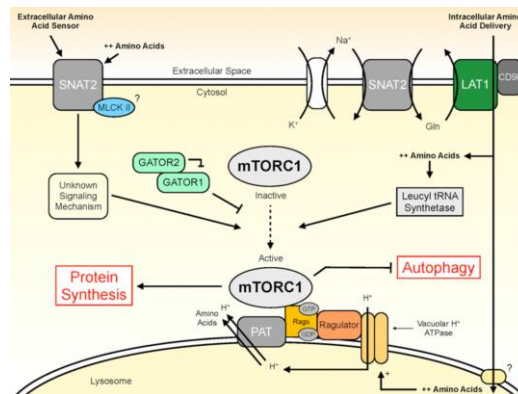
## 1.8.3 Aminosyretransportører i skjelettmuskelceller

I humane skjelettmuskelceller finns det en gruppe aminosyretransportører som transporterer ekstracellulære aminosyrer selektivt inn til cytosol og omvendt, og er involvert i regulering av proteinmetabolisme i skjelettmuskel. Disse transportører deles inn i ulike systemer. Uttrykk av disse transportører er dynamisk og reagerer på ulike stimuli som aminosyreopptak og styrketrening (Tabell 3). Disse to faktorer (inntak av næringsstoffer og trening) er de kraftigste stimulatorer av proteinsyntese i humane skjelettmuskelceller. Studier har vist økt skjelettmuskel mRNA-uttrykk, spesielt av system L aminosyre transportør (LAT1), system A aminosyre transportør (SNAT2) og proton-assistert aminosyretransportør 1 (PAT1), som er hovedregulatorer av mTORC1-signaler, ved økt aminosyretransport inni cellen. Forandringer i uttrykk av disse aminosyretransportører er assosiert med forandringer i muskelstørrelse [52].

**Tabell 3: Oversikt over aminosyretransportører i humane skjelettmuskelceller.** Tabellen er hentet fra [52].

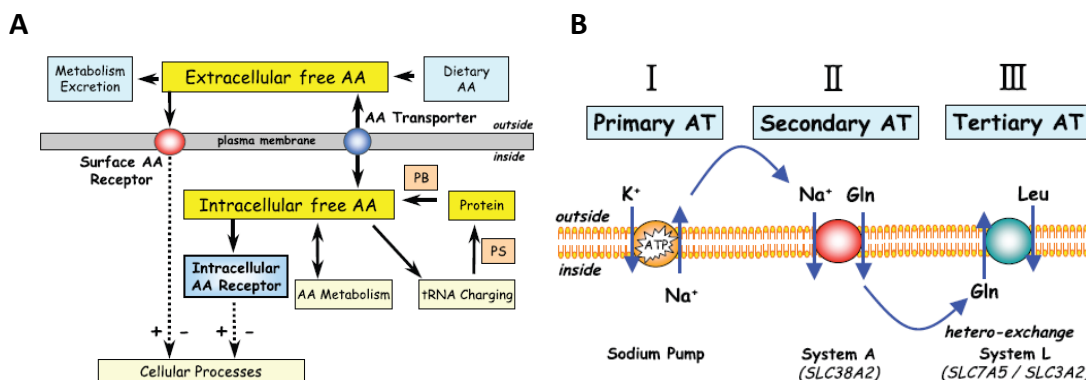
Common Name	System; Description	Gene	Amino Acid Substrates	Amino Acid Ingestion		Resistance Exercise		Resistance Exercise + Amino Acids	
				Young	Older	Young	Older	Young	Older
LAT1	System L; Large Neutral AA Transporter	SLC7A5	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Gln	↑	↑	↑	↑ *	↑↑	↑
SNAT2	System A; Sodium Coupled AA Transporter	SLC38A2	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met	↑	↔	↔	↑	↑↑	↑
PAT1	System Imino; Proton Coupled AA Transporter	SLC36A1	Pro, Gly, Ala	↑	?	↑	↑	↔ ↑	↔
CAT1	System y <sup>+</sup> ; Cationic AA Transporter	SLC7A1	Arg, Lys, His	?	?	↑	↑	↑	↑

Disse transportører er like viktige som de intracellulære aminosyresensorene (beskrevet i neste avsnitt) for å tilrettelegge aktivering av mTORC1 i nærvær av forhøyet intracellulær aminosyretilgjengelighet. I tillegg kan disse transportører ha en dobbeltrolle; som aminosyreleveringssystem til intracellulære aminosyresensorer, og som ekstracellulære aminosyresensorer/reseptorer (transeptorer), spesielt natriumkoblet nøytral aminosyre transportør 2 (SNAT2/system A aminosyre transportør) [52] (Figur 13).



**Figur 13: Skjematisk illustrasjon av mekanismer som regulerer proteinmetabolisme som respons på økt aminosyretilgjengelighet og rollen til aminosyretransportører i dette.** Gln, glutamin; MLCK II, myosin lettjke-kinae II; RAGs, Ras-relaterte GTP-aser. Figuren er hentet fra [52].

Dessuten er størrelsen og sammensetningen av det frie intracellulære aminosyrelageret avhengig av den relative aktiviteten til prosesser som legger til eller fjerner aminosyrer til dette lageret, som syntese og nedbrytning av cellulære proteiner, aminoacyl tRNA-ladning og aminosyre- biosyntese og nedbrytning (Figur 14 A). I tillegg til transportører som påvirkes av aminosyrekonentrasjoner, finnes det også transportører i celler som fungerer som tertiære aktive utvekslere, som system L. System L-transportører er heterodimere proteinkomplekser som består av en lett subenhet (LAT1), som fungerer som en aminosyrepermease, og en glykosert tung subenhet (CD98) som hjelper til med translokasjon og innsetting av transportørkomplekset i plasmamembranen (Figur 14 B) [51].



**Figur 14: A) Prosesser som bidrar til omsetning av frie aminosyrer i dyreceller.** Aminosyretransportører bidrar til både tilstrømming og utstrømming av aminosyrer i cellemembranen. AA, aminosyrer; PS, proteinsyntese; PB, proteinnedbrytning. **B)** Integrering av primær (I), sekundær (II) og tertiær (III) aktiv



transport (AT)-mekanismer kan påvirke transmembran fordeling av bestemte aminosyrer. Sekundær aktiv transport (f.eks. system A/SNAT2) genererer nettobevegelse av aminosyrer fra ekstracellulær til intracellulær aminosyrelager, mens tertiær aktiv transport tillater omfordeling av individuelle aminosyrer via utvekslere som LAT1 (System L) uten å påvirke den totale størrelsen til aminosyrelageret. Figurene er hentet fra [51].

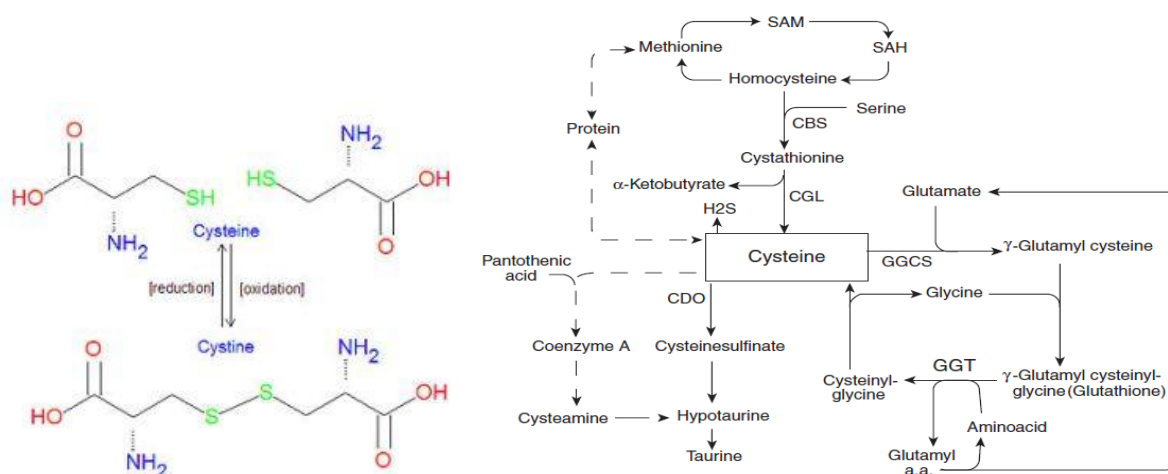
#### **1.8.4 Intracellulære aminosyresensorer i skjelettmuskelceller**

Inni skjelettmuskelceller finns det en rekke sensorer som responderer på aminosyretilgjengelighet og aktiverer mekanistisk target av rapamycinkompleks 1 (mTORC1)-signalering og proteinsyntese. I human skjelettmuskulatur er uttrykket av ulike aminosyretransportører i cellemembranen dynamisk og reagerer på ulike stimuli, noe som indikerer at aminosyretransportører kan ha en unik rolle i regulering av tilpasningen til human skjelettmuskulatur [52].

### **1.9 Aminosyren cystein**

Cystein (Cys) er en svovelholdig aminosyre som regnes som en semiessensiell aminosyre, fordi den kan syntetiseres av den svovelholdige essensielle aminosyren metionin (Met) og den ikke-essensielle aminosyren serin (Ser) via transsulfurering [53].

Cystein kan danne disulfidbindinger og bli oksidert til cystin i kroppen, en egenskap som er viktig for proteinstruktur og stabilitet (Figur 15 A). Fritt cystein i plasma (ikke bundet til proteiner), forekommer enten som homogene (cystin) eller som heterogene (f.eks. homocystein-cystein)-disulfider. Måling av cysteinkonsentrasjon i plasma blir gjengitt som total cystein (tCys) som omfatter alle former for plasmacystein, både fritt, disulfidform og albuminbundet cystein. Plasma tCys er stort sett oksidert (cystin) mens det reduserende miljøet i cytosol medfører at cellulær tCys stort sett er redusert (cystein). Cysteinlageret i kroppen oppstår av proteiner i kosten, omsetning av proteiner i kroppen og endogen syntese fra metionin. Cystein syntetiseres ved transsulfurering av homocystein, som er et produkt av den essensielle aminosyren metionin, en reaksjon som skjer hovedsakelig i leveren. Ved den første reaksjonen, som katalyseres av cystationin  $\beta$ -syntase (CBS), kondenserer homocystein med serin for å danne cystationin, som spaltes av cystationase, og cystein frigjøres (Figur 15 B) [9].



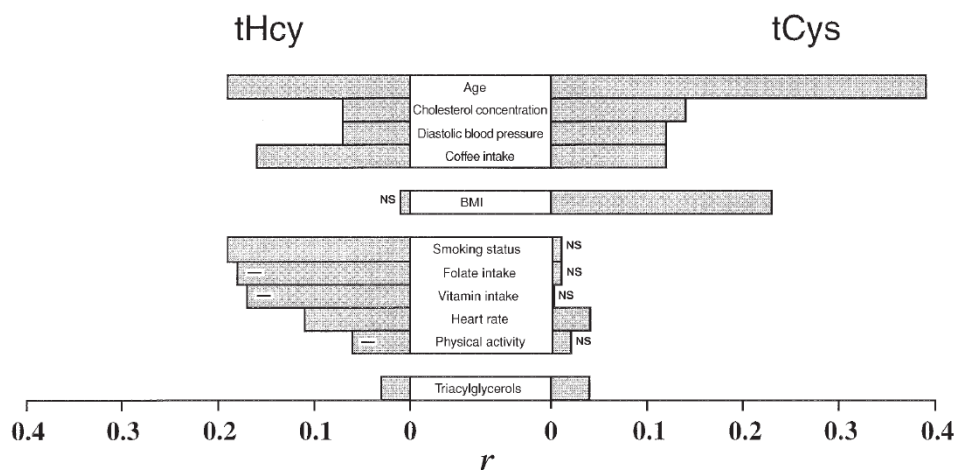
**Figur 15: A) Omdannelse av cystein til cystin.** Cystein omdannes til dimeren cystin under oksidasjon av SH-gruppene for å danne et mer stabilt molekyl [9]. Figuren er hentet fra [54]. **B) Metabolismeveier av cystein.** Cysteinlageret i kroppen dannes av proteiner i kosten, omsetning av proteiner i kroppen og syntese fra metionin hovedsakelig i leveren. Figuren er hentet fra [9].

De to viktige faktorene som regulerer CBS-aktivitet er metionintilgjengelighet og cellulær redoks-tilstand. S-adenosyl metionin (SAM), som er et metioninprodukt og formidler alle transmetyleringsreaksjoner, er en allosterisk aktivator av CBS. Denne regulatoriske mekanismen fremmer fjerning av overflødig metionin ved irreversibel omdannelse til cystein og hemmer cysteinsyntese når metioninnivået er lavt. Enzymet  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT), som finns på cellemembranen av visse celletyper, katalyserer nedbrytning av den ekstracellulære antioksidanten glutathion (GSH) til glutamat og cysteinylglycin, som til slutt frigjør cystein for å bli tatt opp av celler. Studier har vist at genetisk mangel på GGT kan føre til alvorlig mangel på cystein i blodet. Cystein er også en forløper av koenzym A. Ved overskudd av svovelholdige aminosyrer kan cystein bli oksidert til uorganisk svovel og pyruvat som kan videre brukes i glukoneogenese. Cysteinnivå reguleres ved cysteinnedbrytning. Cystein dioksygenase (CDO), katalyserer det første trinnet i cysteinkatabolismen og produksjon av taurin. Ved høye cystein- eller proteinkonsentrasjoner er CDO-uttrykk oppregulert for å fjerne overflødige konsentrasjoner. Denne cysteinresponsen av CDO er vist i lever og fettvev, men ikke i nyrer, lunger eller hjernen, noe som tyder på en sammenheng mellom cystein homeostase og funksjonen til fettvev [9].

### 1.9.1 Cystein og fedme

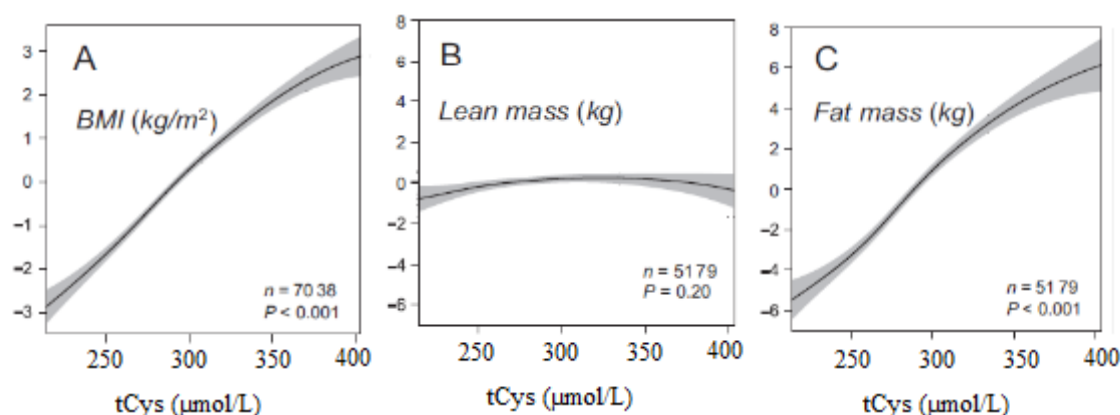
Flere studier har vist en positiv korrelasjon mellom tCys og KMI hos mennesker, men sammenhengen mellom tCys og KMI var ikke hovedfokus i disse studier [9]. I 1999 ble det utført en stor studie i friske men og kvinner (the Hordaland Homocysteine Study) hvor det ble vist at, akkurat som for total homocystein (tHcy) som var studert i tidligere studier, hadde

også tCys positiv sammenheng med flere risikofaktorer for hjerte- karsykdommer som alder, kjønn, total kolesterolkonsentrasjon, diastolisk blodtrykk og kaffeinntak. Det ble vist i denne studien at KMI var en sterk bestemmende faktor for tCys, men KMI var ikke relatert til tHcy (Figur 16) [55].



**Figur 16: Forholdet mellom tCys og tHcy og flere risikofaktorer for hjerte- karsykdommer.** Minustegnet indikerer en negativ korrelasjon med  $p > 0,05$ . Figuren er hentet fra [55].

Langsgående funn av samme studie i 2003 viste at endringer i BMI forutså endringer i tCys over tid, men disse og andre studier som viste tCys-KMI-forholdet spesifiserte ikke om tCys var relatert til fettmasse eller til muskelmasse [9]. En senere studie i 2008 viste at det var et positiv lineært forhold mellom tCys og fettmasse, men ingen assosiasjon mellom tCys og muskelmasse (Figur 17). Denne assosiasjonen mellom tCys og fettmasse forble robust selv etter justering for alder, kjønn, muskelmasse; inntak av protein, fett og total energi gjennom kosten og plasmalipidkonsentrasjoner. I tillegg var økning i tCys over 6 år assosiert med høyere fettmasse ved oppfølging [10].



**Figur 17: Assosiasjon av tCys med BMI, totalkroppens muskelmasse og totalkroppens fettmasse.** Grafene er justert for alder og kjønn. I tillegg er (B) justert for fett masse og (C) justert for muskelmasse. Figuren er hentet og modifisert fra [10].

Siden disse studier ikke var intervensjonsstudier, var det to muligheter for tolking av funnene: at høy cystein bidro til fedme, eller at fedme påvirket cysteinomsetning og dermed økte plasma tCys [9]. En annen studie i 2011, som studerte forandringer i plasmakonsentrasjon av svovelholdige aminosyrer hos personer med høy fedme som gjennomgikk fedmeoperasjon, viste at til tross for 30 % vektreduksjon etter operasjonen og nedgang i metionin, cystationin og glutamat, var det ikke en signifikant forandring i plasma tCys hos pasientene som gjennomgikk gastrisk bypass operasjon. Hos pasienter som gjennomgikk «duodonal switch» operasjon ble det derimot observert 12 % nedgang i tCys, men dette kunne være relatert til malabsorpsjon av cystein. Disse funnene viste derfor at kropps fettmasse ikke var en bestemmende faktor for plasma tCys-konsentrasjoner [56]. En tredje mulighet er at en eller flere konfunderende faktorer øker samtidig plasmacystein og disponerer for fedme, eller at cystein er en markør knyttet til fedme eller fedme relatert sykелighet. En av disse konfunderende faktorene kan være GGT-enzymaktivitet som kan tenkes å være økt via en ukjent mekanisme hos personer med fedme. En studie har imidlertid vist at plasma tCys var assosiert med BMI uavhengig av GGT-aktivitet [9]. Studier i dyr har vist at cystein hemmer katekolaminindusert lipolyse i musefettceller via produksjon av hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ). Andre eldre studier i rotter har vist at cystein øker oksidasjon av glukose og dens utnyttelse i de novo lipogenese [57].

## **1.10 Substanser benyttet i forsøkene**

### **1.10.1 Oljesyre**

I denne oppgaven ble det sett på effekt av cystein på lagring av lipiddråper. For å få cellene til å lage lipiddråper, ble det tilsatt oljesyre (OA) i differensieringsmediet. OA er en enumettet fettsyre (18:1 n-9) [58]. OA og palmitinsyre (PA), som er en mettet fettsyre, er de vanligste av enumettede og mettede sirkulerende plasmalipider [59]. Studier i muskel tyder på at OA følger en annen metabolsk vei enn PA i humane skjelettmuskelceller. Det skjer høyere akkumulering av OA enn PA i TAG, mens mer PA enn OA blir tatt inn i fosfolipider. PA undergår mindre lipolyse enn OA, til tross for økt innhold av ATGL, og den viser en høyere fettsyreoksidasjon i mitokondrier enn OA. Disse funnene kan være relevante i forståelsen og forklaringen av forholdet mellom fettinntak gjennom kosten og insulinresistens i skjelettmuskel, i det at utvikling av insulin resistens har en positiv korrelasjon med mettede fettsyrer i kosten mens den derimot har en negativ korrelasjon med enumettede fettsyrer [58].

## 2 Mål for oppgaven

Flere studier har vist en positiv korrelasjon mellom totalcystein i plasma (tCys) og kroppsmasseindeks (KMI) hos mennesker, og det er vist et positiv lineært forhold mellom tCys og fettmasse. Studier i dyr har blant annet vist at cystein hemmer lipolyse i musefettceller. Imidlertid er rollen til cystein i celler og sammenhengen mellom cystein og KMI uklart. På bakgrunn av disse studiene og andre studier som har vist lignende funn, var hovedmålet for denne oppgaven å undersøke om cysteinkonsentrasjon i dyrkningsmedium påvirket lagring av lipiddråper i myotuber fra mus, og om det påvirket myoblastenes evne til å differensiere til myotuber.

Målene for oppgaven var å:

- observere morfologisk effekt av lav cystein under differensiering på lagring av lipiddråper i to ulike myotuber (C2C12 og Sol8)
- måle triglyseridkonsentrasjoner i prøver av Sol8-myotuber behandlet med lave cysteinkonsentrasjoner under differensiering
- måle protein- og DNA-konsentrasjoner i prøver av Sol8-celler behandlet med ulike cysteinkonsentrasjoner under differensiering
- observere morfologisk effekt av lav cystein på differensiering av C2C12 og Sol8 myoblaster
- studere uttrykk av differensieringsmarkører og muskelfibergener i C2C12 og Sol8 celler ved qRT-PCR
- isolere rene lipiddråper fra Sol8-myotuber ved hjelp av teknikkene nitrogenkavitasjon og ultrasentrifugering med tetthetsgradient av sukrose

# 3 Materialer

## 3.1 Kjemikalier

### Produkt

BODIPY [#D3922]  
Bovint serum albumin (BSA) [#A8806]  
Complete (Mini) proteaseinhibitor tabletter  
Deoksynukleotider (dATP, dCTP, dGTP og dTTP)  
Dimetylsulfoksid (DMSO)  
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) -  
høy glukose ([+] 4,5 g/L Glukose, [-] L-Glutamin,  
[-] Natriumpyruvat, [-] L-Metionin and L-Cystin)  
[#21013-024]  
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) -  
høy glukose (med L-Glutamin og 4,5 g/L Glukose)  
[#D5648]  
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) -  
uten kalsiumklorid og magnesiumklorid [#D8537]  
Etanol  
Fosfatbuffret saltvann (PBS) tabletter  
Føtal Bovint Serum (FBS) [#F7524]  
HEPES buffer [#H4034]  
Hesteserum  
Hydrogenklorid (HCl, 37 %)  
Isopropanol  
Kollagen I [#C3867]  
L-Cystin [#C7602]  
L-Glutamin [#G7513]  
L-Metionin [#M5308]  
MilliQ vann  
Monteringsmedium med DAPI [#DUO82040]  
Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)

### Produsent

Molecular Probes®  
Sigma®  
Roche Diagnostics  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Arcus  
Gibco®  
Sigma®  
Sigma®  
Gibco®  
MERCK  
Arcus  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Sigma®  
Millipore  
Duolink®  
Sigma®

Natriumhydroksid [#71687]	Sigma <sup>®</sup>
Natriumpyruvat [#P4562]	Sigma <sup>®</sup>
Nucleic Acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems <sup>®</sup>
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems <sup>®</sup>
Oil Red O	Sigma <sup>®</sup>
Oljesyre (OA)	Nu-Chek Prep
Paraformaldehyd (PFA) [#P6148]	Sigma <sup>®</sup>
PCR-vann [#W4502]	Sigma <sup>®</sup>
Penicillin-Streptomycin solution [#P4458]	Sigma <sup>®</sup>
RNA Purification Wash Solution 1	Applied Biosystems <sup>®</sup>
RNA Purification Wash Solution 2	Applied Biosystems <sup>®</sup>
Sukrose [#S1888]	Sigma <sup>®</sup>
SuperScript <sup>®</sup> III Reverse Transcriptase [#18080-051]	Invitrogen <sup>™</sup>
Tilfeldige heksamerprimer (NNNNNN)	Sigma <sup>®</sup>
Tricin [#T9784]	Sigma <sup>®</sup>
Trypsin-EDTA løsning [#T3924]	Sigma <sup>®</sup>
Tryptanblått 0,4 %	Bio-Rad Laboratories

## 3.2 Utstyr

### Produkt

Aluminiumfolie  
 Begerglass (250 og 500 ml)  
 Celledyrkningsbrett (12-brønners)  
 Celledyrkningsflasker (75 cm<sup>2</sup>)  
 Celledyrkningsस्कål/Petriskål (100 x 20 mm)  
 Celleskraper (25 cm)  
 Dekkglass (18 mm)  
 Glasspipetter (2, 5, 10 og 25 ml)  
 Kryorør (Nunc<sup>®</sup>)  
 MicroAmp<sup>™</sup> Optical 96-Well Reaction Plate  
 MicroAmp<sup>™</sup> Optical Adhesive Film  
 Mikroplater (96 brønners, F-bunn)

### Produsent

Wrap Film Systems  
 VWR<sup>®</sup>  
 Falcon<sup>®</sup>  
 Falcon<sup>®</sup>  
 Falcon<sup>®</sup>  
 Sarstedt  
 Marienfeld  
 Falcon<sup>®</sup>  
 Sigma<sup>®</sup>  
 Applied Biosystems<sup>®</sup>  
 Applied Biosystems<sup>®</sup>  
 Greiner Bio-One

Mikrorør (1,5 ml)  
 Oppbevaringsflasker for medier (500 ml)  
 Papp frysebokser  
 Parafilm laboratoriefilm  
 PCR rør og lokk (0,2 ml)  
 Pipetboy pipettor  
 Pipetter  
 Pipettespisser  
 Sentrifugerør (15 og 50 ml)  
 Splash Guards  
 Sprøyter (10 ml)  
 Sterile hansker (Kimtech)  
 Sterile prøytefilter (0,45 µm)  
 Telleslide  
 Total RNA Purification Tray  
 Ultrasentrifugerør (11 x 60 mm)

Sarstedt  
 Corning Life Sciences  
 Sarstedt, Sigma<sup>®</sup>  
 Bemis  
 Thermo Scientific  
 Integra Biosciences  
 Eppendorf Research<sup>®</sup>  
 ART<sup>®</sup>, Biotix<sup>®</sup>  
 Falcon<sup>®</sup>  
 Applied Biosystems<sup>®</sup>  
 Terumo<sup>®</sup>  
 Kimberly-Clark Professional  
 Acrodisc<sup>®</sup>  
 Bio-Rad Laboratories  
 Applied Biosystems<sup>®</sup>  
 Beckman Coulter<sup>®</sup>

### 3.3 Instrumenter

#### Produkt

Automatisk celledetektor (TC20)  
 Avtrekkskap  
 Cell Disruption vessel (Nitrogenbombe)  
 CO2 inkubator (Steri-Cycle)  
 ColorView Soft Imaging System  
 Fast Real-Time PCR System (7900HT)  
 Fluorescens mikroskop (Heating Units XLS)  
 Fryser (-20°C)  
 Fryser (Revco<sup>TM</sup> UxF -86°C)  
 Ismaskin (KF85)  
 Kalkulator (TI-50I)  
 Kjøleskap (MediLine 5°C)  
 Kjøleskap + Fryser

#### Produsent

Bio-Rad Laboratories  
 Kilab AS  
 PARR<sup>®</sup> Instrument  
 Thermo Forma<sup>TM</sup>  
 OLYMPUS  
 Applied Biosystems<sup>®</sup>  
 Zeiss  
 Zanussi, Liebherr  
 Thermo Scientific  
 Porkka  
 Texas Instruments  
 Liebherr  
 Whirlpool



Labvekt	Sartorius
Lysmikroskop (CKX41)	OLYMPUS
Mikroplateleser (Multiskan Plus MKII)	Titertek
Milli-Q vannrensesystem	Millipore
NanoDrop-1000 spektrofotometer	Saveen & Werner AB
Nucleic Acid PrepStation (ABI Prism <sup>®</sup> 6100)	Applied Biosystems <sup>®</sup>
PCR maskin (Mastercycler Epgradient S)	Eppendorf
pH-meter (MeterLab <sup>®</sup> , PHM210)	Radiometer Analytical
Printer til mikroplateleser (ThinkJet)	Hewlett Packard
Sentrifuger (Biofuge Fresco)	Heraeus Instruments
Sentrifuger (Function Line)	Heraeus Instruments
Sonikator (Sonifier 450)	BRANSON
Sterilbenk (Silverline Blue Series)	Kojair <sup>®</sup>
Ultracentrifuger (XL-90)	Beckman Coulter <sup>®</sup>
Vakuumpumpe (Vacusafe Comfort)	Integra Biosciences
Vannbad (Julabo ED)	Julabo
Virvelmikser	VWR <sup>®</sup>

### 3.4 Kits

#### Produkt

KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Kit [#KR0389]  
Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit [#23225]  
Triglycerides Enzymatique PAP 150

#### Produsent

KAPA Biosystems  
Thermo Scientific  
BioMerieux

### 3.5 Cellelinjer

#### Produkt

C2C12, musemyoblaster [#CRL-1772<sup>TM</sup>]  
Sol8, musemyoblaster [#CRL-2174<sup>TM</sup>]

#### Produsent

ATCC<sup>®</sup>  
ATCC<sup>®</sup>

### 3.6 Programvare og internettressurser

<b>Produkt</b>	<b>Produsent</b>
AxioVision software, Rel.4.8	Zeiss
Cell <sup>A</sup> Imaging	OLYMPUS
EndNote	Thomson Reuters
Google Scholar	Google Inc.
Microsoft Office 2010	Microsoft <sup>®</sup>
ND-1000 software	Saveen & Werner AB
PubMed	National Library of Medicine
RQ Manager	Applied Biosystem <sup>®</sup>
SDS Software 2.3	Applied Biosystem <sup>®</sup>

## 4 Metoder

### 4.1 Celledyrking

#### 4.1.1 Generelle arbeidsrutiner i cellelaboratorium

I cellelaboratorium skal det alltid brukes hansker og hendene skal vaskes både før og etter laboratoriearbeid. Det skal jobbes effektivt for å redusere tiden cellekulturer står utenfor inkubator. Under celledyrking og arbeid med levende celler skal det jobbes i sterilbenk og det skal brukes sterilt utstyr for å unngå kontaminering av celler og vekst av bakterier eller sopp i cellekulturer. Det skal unngås å flytte ting over åpne medieflasker og cellekulturer med hender eller armer. Pipetter som har vært borti celler eller ikke-sterile materiell skal ikke komme i kontakt med flasker av sterile medier. Viften på sterilbenk skal slås på 5-10 minutter før bruk og benken skal sprayes med 70 % etanol. Søl av brukt medium i sterilbenk eller inkubatorskap skal tørkes av, vaskes med MilliQ-vann og sprayes med 70 % etanol. Etter endt arbeid skal sterilbenken og automatpipetter rengjøres med MilliQ-vann og sprayes med 70 % etanol. Celler skal drepes med 0,1 M NaOH tilsatt 1:10 minst to minutter før mediet blir helt i vasken. Kun cellelinjer, materiell som har vært i kontakt med celler og medium med farlige kjemikalier skal kastes i gule containere merket med «biologisk materiale». Alt annet avfall skal kastes i vanlig avfallsbøtte. Alle medier, løsninger og reagenser skal merkes med navn, initialer og dato de er blitt laget eller åpnet. Alle celleflasker og andre celledyrkningsutstyr med dyrkede celler skal også merkes med navn, dato, forsøksnummer og initialer.

### 4.1.2 Cellelinjer

I denne oppgaven ble det benyttet celler fra Sol8 og C2C12 cellelinjer (Tabell 4).

**Tabell 4: Cellelinjekarakteristika.** Hentet fra produktbladene til Sol8 [#CRL-2174™] og C2C12 [#CRL-1772™].

	<b>Cellelinje</b>	
<b>Cellekarakteristika</b>	<b>Sol8</b>	<b>C2C12</b>
<b>Organisme</b>	Mus	Mus
<b>Stamme</b>	C3H	C3H
<b>Vev</b>	Skjelettmuskel	Skjelettmuskel
<b>Utleidning</b>	Isolert fra primære kulturer av soleusmuskel	Subklon av cellelinje fra musemyoblast
<b>Celletype</b>	Myoblast	Myoblast
<b>Morfologi</b>	Fibroblast	Myoblast
<b>Differensiering</b>	Differensierer til myotuber ved serummangel	Differensierer til myotuber ved serummangel
<b>Oppbevaring</b>	Flytende nitrogen (dampfase)	Flytende nitrogen (dampfase)

### 4.1.3 Uttak av celler fra cellebank og utsåing i celledyrkningsflaske

Kryorør med celler, som ble lagret i nitrogentank med flytende nitrogen, ble tatt opp for å så ut til proliferasjon. Røret ble tint raskt på vannbad ved 37 °C og cellene ble overført til 75 cm<sup>2</sup> celledyrkningsflaske (celleflaske/flaske) ved hjelp av sterilpipette og tilsatt 20 ml vekstmedium (vedlegg 9.1.3). Utsådde celler ble inkubert i inkubatorskap ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> for proliferering av celler. Vekstmediet ble skiftet neste dag for å fjerne DMSO fra nedfrysningsmediet.

### 4.1.4 Splitting av cellekultur

Det er viktig at Sol8 og C2C12 celler ikke vokser seg konfluent under proliferasjon i vekstmedium for å unngå at myoblaster spontandifferensieres til myotuber og forandrer egenskap. På grunn av dette ble C2C12 og Sol8 cellekulturer splittet når de var 50-70 % konfluente.

Gammelt medium ble sugd av og fjernet fra celler utsådd i flaske med glasspipette. Cellene ble vasket raskt med 2 ml Trypsin-EDTA løsning (trypsin) for å fjerne rester av mediet. Trypsinløsningen ble fjernet, cellene ble tilsatt 3 ml ny trypsin og inkubert ved 37 °C i 1-2 minutter for å få cellene til å løsne. Etter inkubering ble flasken dunket forsiktig mot

håndleddet et par ganger for å rive løs resten av cellene fra flasken. Cellene ble tilsatt 7 ml vekstmedium for å inaktivere trypsinet og mediet ble overført til et sentrifugerør. Cellesuspensjon ble sentrifugert ved 1300 rpm for 3 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og cellepelletten ble løst opp i 10 ml nytt vekstmedium ved å pipettere mediet opp og ned på cellepelletten i røret. 0,5-5 ml av denne cellesuspensjonen ble overført til nye celleflasker sammen med 10 ml vekstmedium i hver flaske (splittet 1:20~1:2 tilsvarende). Cellene ble inkubert ved 37 °C for å proliferere videre til å sås ut til forsøk.

#### 4.1.5 Nedfrysing av celler til cellebank

Medier og fryserør (kryorør) ble satt på is. Cellene ble trypsinert som beskrevet under 'splitting av celler' (4.1.4) og sentrifugert ved 1300 rpm for 3 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten ble løst opp i vekstmedium. Lik mengde med frysemedium (vedlegg 9.1.4) ble tilsatt røret med cellesuspensjonen og blandet godt. Cellesuspensjonen ble fordelt i fryserør. Cellene ble fryst ved -70 °C i 24 timer. Deretter ble de flyttet og lagret i flytende nitrogen.

#### 4.1.6 Celletelling og utsåing til forsøk i 12-brønners brett/petriskål

Før utsåing til forsøk i 12-brønnersbrett eller petriskål ble cellene telt på automatisk celleteller for å så ut passende antall celler i forhold til bunnarealet til brønnen/skålen (Tabell 5).

**Tabell 5: Utsåingsoversikt.**

Type brønn	Bunnareal	Antall celler/brønn	Volum cellesuspensjon	Metode
12-brønner (Falcon®)	3,8 cm <sup>2</sup>	120.000 (Sol8) 60.000 (C2C12)	1 ml	Mikroskopering, qRT-PCR, Proteinmåling, Triglyseridmåling
Petriskål (Falcon®)	75 cm <sup>2</sup>	1.200.000 (Sol8)	10 ml	LD-isolering
Petriskål med glassbunn (MatTek)	9,6 cm <sup>2</sup>	300.000 (Sol8)	2,5 ml	Mikroskopering

For å få en cellesuspensjon ble cellene trypsinert som beskrevet under 'splitting av celler' (4.1.4) og sentrifugert ved 1300 rpm for 3 minutter. 20 µl av cellesuspensjonen ble overført til et Eppendorfrør og blandet med 20 µl tryptanblått 0,4 % løsning. 10 µl av denne

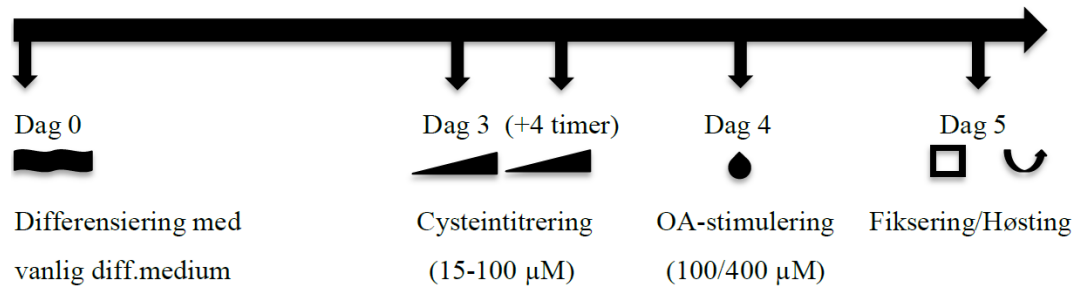
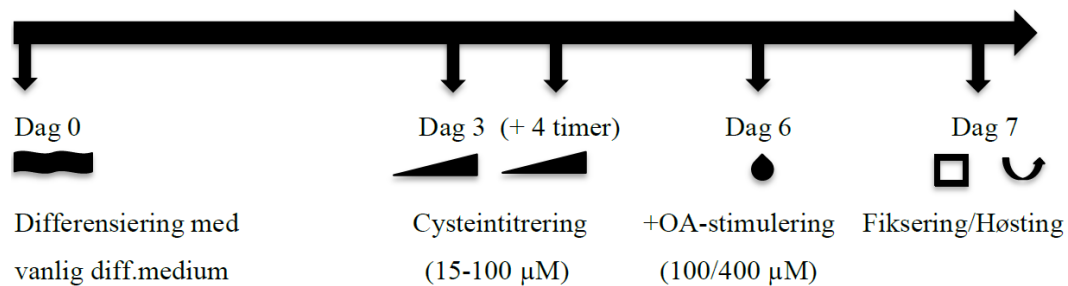
blandingen ble overført til kammeret på en telleslide. Automatisk celledetektor ble skrudd på og tellesliden ble satt inn. Celledetektoren telte totalt antall levende og døde celler i cellesuspensjonen. Den beregnede mengden cellesuspensjon som trengtes for utsåing ble overført til en celleflaske sammen med nødvendig mengde vekstmedium og blandet godt før utsåing i 12-brønnersbrett eller petriskål. Cellene ble sådd ut etter Tabell 5 ved å pipettere med glasspipette og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Vekstmediet ble skiftet hver tredje dag frem til 90-100 % konfluens før differensiering ble induisert.

#### **4.1.7 Differensiering og stimulering med oljesyre**

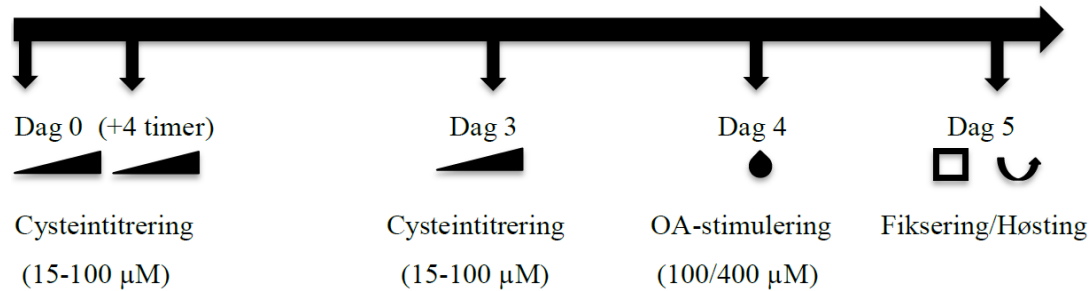
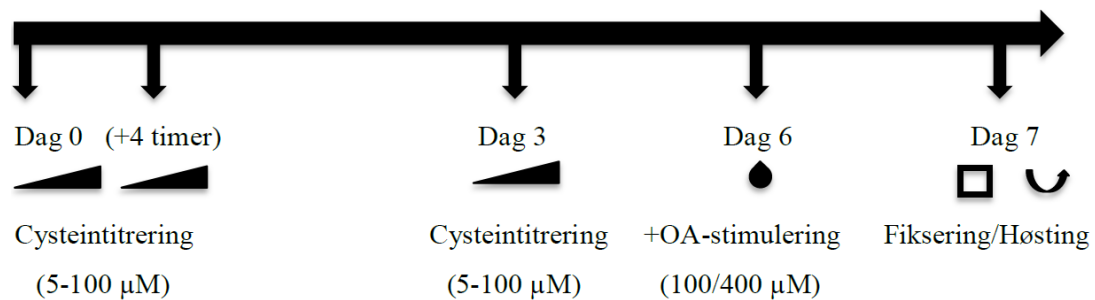
Både Sol8 og C2C12 cellekultur oppnådde 90-100 % konfluens etter 2 døgn. Da ble vekstmedium erstattet med differensieringsmedium, noe som gjorde at myoblastene sluttet å dele seg (proliferere) og begynte isteden å differensiere seg fra enkjernede myoblaste til flerkjernede myotuber som ble brukt til forsøk. Differensieringsmedium ble pipettert forsiktig mot veggen til brønnen/skålen for å unngå at cellene løsnet seg.

I denne oppgaven blir uttrykket «vanlig differensieringsmedium» brukt for differensieringsmediet med normal cysteinkonsentrasjon (400 µM, vedlegg 9.1.4), mens «cysteintitreringsmedier» blir brukt for differensieringsmedier uten L-Metionin og L-Cystin i utgangspunktet, som ble tilsatt L-Metionin (vedlegg 9.1.6) til sluttkonsentrasjon på 30 µM og økende mengder L-Cystin (vedlegg 9.1.7) til sluttkonsentrasjon på 5-100 µM (cysteintitrering) (vedlegg 9.1.9).

Kontrollcellene ble behandlet med vanlig differensieringsmedium under hele differensieringen (fra dag 0). Testcellene som skulle bli brukt for å undersøke effekt av cystein på akkumulering av LDer i myotuber ble behandlet med vanlig differensieringsmedium de første 2-3 dagene av differensiering, deretter ble mediet erstattet med cysteintitreringsmedium. Testcellene som skulle brukes for å undersøke effekt av cystein på differensiering av myoblaste ble derimot behandlet med cysteintitreringsmedium under hele differensieringen (fra dag 0). Cellene ble differensiert i 4 -7 dager før de enten ble fiksert eller høstet. Sol8 cellene var raskere til å differensiere seg enn C2C12 cellene, derfor fikk de differensiere i 5 dager, mens C2C12 cellene fikk differensiere i 7 dager (Figur 19 og Figur 18). Cellene ble stimulert til å lage lipiddråper ved å tilsette 100 µM eller 400 µM oljesyre (vedlegg 9.2.2) i mediet 24 timer før cellene ble fiksert, farget og mikroskopert, eller høstet til å måle triglyseridkonsentrasjon, proteinkonsentrasjon eller til å bestemme mengden av utvalgte mRNA i prøvene ved kvantitativ sanntids-PCR.

**A****B**

**Figur 18: Eksperimentsoppsett for effekt på lipiddråpeakkumulering.** Eksperimentsoppsett for Sol8 celler (A) og C2C12 celler (B) for å undersøke effekt av cystein på lagring av lipiddråper i myotuber.

**A****B**

**Figur 19: Eksperimentsoppsett for effekt på differensiering.** Eksperimentsoppsett for Sol8 celler (A) og C2C12 celler (B) for å undersøke effekt av cystein på differensiering av myoblaster.

## **4.2 Fiksering av celler i 12-brønnersbrett og farging av lipiddråper med Oil Red O eller Bodipy**

Etter fjerning av gammelt medium fra brønnene ble cellene vasket forsiktig to ganger med 1 ml PBS (per brønn for 12 brønners brett) for å fjerne rester av medium. PBS ble fjernet og cellene ble fiksert med 1 ml 4 % paraformaldehyd (vedlegg 9.3.1) for 15 minutter. PFA virker ved å kryssbinde proteiner og herde vev og membraner. Etter 15 minutter ble PFA fjernet og på grunn av dens karsinogene og allergifremkallende effekt, ble løsningen inneholdende PFA samlet i egen beholder for senere behandling som miljøskadelig avfall, og alt arbeidet med fiksering ble utført i avtrekkskap. Etter fjerning av PFA ble cellene vasket to ganger med 2 ml PBS og oppbevart i 1 ml PBS ved 4 °C inntil farging med enten Oil Red-O eller Bodipy for å observere effekt av cystein på antall og/eller størrelse til lipiddråper i myotuber.

### **4.2.1 Farging med Bodipy og DAPI**

Bodipy (493/503) er et fluorescerende fargestoff som akkumuleres i lipiddråper og eksiterer grønn farge (503 nm), noe som gjør lipiddråpene synlige i fluorescensmikroskop når de utsettes for lys med bølgelengde 493 nm. Rett før farging ble Bodipy løst i DMSO (1 mM) fortynnet 10.000 ganger i PBS, slik at cellene ble inkubert med 0,1 nM Bodipy (493/503). PBS ble fjernet og cellene ble inkubert i 500 µl Bodipy fortynning i mørke ved å pakke 12-brønnersbrettet med aluminiumsfolie. Etter 15 minutter ble cellene vasket to ganger med 1 ml PBS. Etter at alt PBS var fjernet ble 30 µl monteringsmedium med DAPI pipettert i midten av brønnene og dekkglass ble satt på med pinsett. DAPI i monteringsmediet er et fluorescerende fargestoff som eksiterer ved ~360 nm og emitterer ved ~460 nm og sender blått fluorescens når det er bundet til DNA, noe som gjør cellekjernene synlige i fluorescensmikroskop.

### **4.2.2 Farging med Oil Red O**

PBS ble fjernet og cellene ble vasket to ganger med 2 ml dH<sub>2</sub>O for å fjerne rester av PBS. Cellene ble farget ved å pipettere 500 µl Oil Red O løsning (vedlegg 9.3.2) til hver brønn og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Etter 15 minutter ble brettet virvlet for å få det rødsvarte komplekset som ble dannet i løsningen av cellelaget. Oil Red O løsningen ble samtidig vasket av ved langsom tilsetning og etterfølgende fjerning av dH<sub>2</sub>O. Dette ble



gjentatt til løsningen ble klar. Det er viktig at hele løsningen ikke blir fjernet med en gang men litt og litt inntil alle uønskede krystaller vaskes av. Denne fremgangsmåten reduserer muligheten for at Oil Red O krystaller, som naturlig dannes under fargingen, fester seg til cellene og gir farging utenom lipiddråper. Cellene ble til sist vasket med 2 ml PBS og oppbevart i 1 ml PBS inntil mikroskopering. Oil Red O farger lipiddråper i cellene røde og gjør dem synlige i lysmikroskop.

### **4.3 Mikroskopering**

For å undersøke effekt av cystein på differensiering av myoblaster til myotuber ble cellene observert morfologisk og fotografert i lysmikroskop med 10x og 20x objektiver.

For å undersøke effekt av cystein på lagring av lipiddråper i myotuber ble lipiddråper i fikserte celler farget enten med Bodipy (493/503) og DAPI, eller med Oil Red O. Cellene som ble farget med Bodipy (493/503) og DAPI ble observert og fotografert i fluorescensmikroskop med 10x objektiv. Cellene som ble farget med Oil Red O ble observert og fotografert i lysmikroskop med 10x og 20x objektiver.

### **4.4 Kvantifisering av triglyserider**

For å undersøke om cystein har effekt på akkumulering av lipiddråper i myotuber ble konsentrasjonen av triglyserider målt i prøver etter at de var sonikert (se 4.5.2).

Triglyseridkonsentrasjonen i prøvene ble målt med Triglycerides Enzymatique PAP 150. Metoden er basert på en fire-trinns reaksjon hvor triglyserider omdannes til quinoneimine. Intensitet av fargen fra quinoneimine som blir målt er proporsjonal med triglyseridinnholdet i prøvene. Triglyseridkonsentrasjonen i prøvene ble målt i 96-brønners mikropate. Nøyaktig pipettering er avgjørende for riktig resultat i denne prosedyren.

25 ml av Reagens 2 ble overført til en flaske med Reagens 3 (pulver) og ble blandet godt.

40 µl Reagens 1 (standard) med konsentrasjon 2 µg/µl ble blandet forsiktig med 40 µl dH<sub>2</sub>O (fortynnet 1:1) for å lage standardkurve.

Økende volum av standarden (TAG) med kjent konsentrasjon (1 µg/µl) ble pipettert til 96-brønners mikropate i to eksemplarer av hver standardkonsentrasjon for å kontrollere riktig pipettering (Tabell 6).

**Tabell 6: TAG standarder.**

<b>Standard</b>	<b>TAG standard/reagens 1 (1 µg/µl)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>
TG 0 µg	0 µl	10 µl
TG 1 µg	1 µl	9 µl
TG 2 µg	2 µl	8 µl
TG 3 µg	3 µl	7 µl
TG 4 µg	4 µl	6 µl
TG 6 µg	6 µl	4 µl
TG 8 µg	8 µl	2 µl
TG 20 µg	10 µl	0 µl

Eppendorfrør med prøver ble tint på is og virvlet på virvelmikser. 10 µl av hver prøve ble pipetert til nye brønner (et eksemplar av hver prøve). 200 µl av blandet reagens (Reagens 2 + Reagens 3) ble pipetert til hver brønn (både standarder og prøver). Platen ble ristet forsiktig, for å blande innholdet i brønnene, og inkubert ved 37 °C i 5 minutter.

Absorbansen ble målt ved 530 nm på mikroplateleser. Det ble laget standardkurve basert på graden av absorbans til standarder på samme måte som for proteinmåling, og konsentrasjonen av triglyserid i prøvene ble beregnet ut fra standardkurven.

## **4.5 Kvantifisering av proteiner**

### **4.5.1 Høsting av prøver i 12-brønnersbrett**

25 x Complete stock (vedlegg 9.4.1), RIPA-buffer (vedlegg 9.4.2) og lyseringsbuffer med RIPA og Complete (vedlegg 9.4.3) ble laget. Complete er proteaseinhibitor som beskytter proteinene mot et bredt spekter av proteaser og RIPA-buffer lyserer og ekstraherer proteiner fra dyrkede celler effektivt.

Alt arbeidet foregikk på is. Gammelt medium ble fjernet fra brønner. Cellene ble vasket to ganger med 1 ml iskald PBS. 25 µl lyseringsbuffer (RIPA tilsatt Complete) ble tilsatt til hver brønn. Cellene ble skrapet med celleskraper og innholdet fra fire brønner ble overført til et Eppendorfrør. Prøvene ble lagret ved -80° C inntil proteinmåling.

### **4.5.2 Sonikering av prøver**

Før måling av proteinkonsentrasjon ble prøvene sonikert for å få dem homogenisert, noe som var viktig for riktig måling av proteinkonsentrasjonen. Sonikering er prosessen som konverterer et elektrisk signal til fysisk vibrasjon som kan rettes mot prøvene for å ødelegge cellemembraner og andre cellestrukturer, noe som emulgerer og homogeniserer prøvene.

Sonikeringen ble utført på Branson Sonifier<sup>®</sup> som er en ultralyd celleødelegger. Prøvene ble satt inn i is og sonikert inntil prøvene var homogene (ca. 2x10 sekunder, puls i 0,8 sek per sek med 70 % effektivitet).

### 4.5.3 Proteinmåling

Proteinkonsentrasjon i prøvene ble målt med Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit. Metoden er basert på en to-trinns reaksjon, hvor  $\text{Cu}^{2+}$  først reduseres til  $\text{Cu}^{1+}$  som danner et kompleks med protein amidbindinger (Biuret reaksjon). I det andre trinnet danner bisinkoninicsyre (BCA) et lilla kompleks med  $\text{Cu}^{1+}$  som kan detekteres ved 562 nm. Proteinkonsentrasjon i prøvene ble målt i 96-brønners mikroplate. Nøyaktig pipettering er avgjørende for riktig resultat i denne prosedyren.

Standarder ble generert ved hjelp av økende volum av bovint serum albumin (BSA) med kjent konsentrasjon (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Tabell 7). Det ble pipettert to paralleller av samme standardkonsentrasjon inn i 96-brønners mikroplate for å kontrollere riktig pipettering.

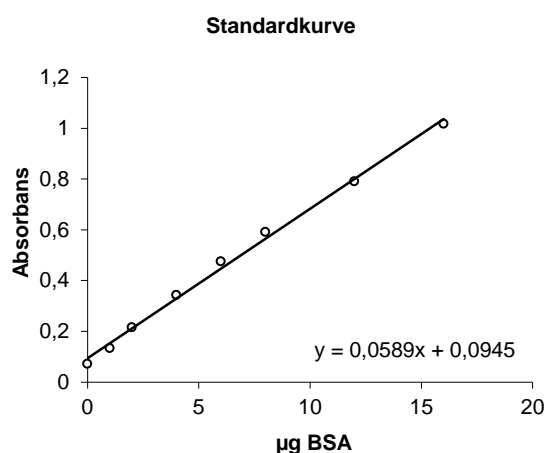
**Tabell 7: BSA standarder.**

Standard	BSA standard (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O
1. Standard 0 $\mu\text{g}$	0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
2. Standard 1 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{l}$	9,5 $\mu\text{l}$
3. Standard 2 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$
4. Standard 4 $\mu\text{g}$	2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
5. Standard 6 $\mu\text{g}$	3 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$
6. Standard 8 $\mu\text{g}$	4 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
7. Standard 12 $\mu\text{g}$	6 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
8. Standard 16 $\mu\text{g}$	8 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$

Eppendorfrør med prøver ble tint på is og virvlet på virvelmikser. 1  $\mu\text{l}$  av hver prøve og 9  $\mu\text{l}$  vann (10  $\mu\text{l}$  totalt volum) ble pipettert til nye brønner (to eksemplarer av hver prøve).

Total mengde blandet BC reagens, som var nødvendig for både standarder og prøver, ble beregnet og mengde BCA-reagens A og BCA-reagens B ble blandet i forholdet 50:1. 200  $\mu\text{l}$  av blandet BC-reagens ble pipettert til hver brønn med både standard og prøver. Platen ble ristet forsiktig for å blande innholdet i brønnene, dekket med plast og inkubert ved 37 °C for 30 minutter.

Absorbansen ble målt ved 562 nm på mikroplateleser. Det ble laget standardkurve basert på absorbansen til de 8 standardene (Figur 20) og konsentrasjon av protein i prøvene ble beregnet ut fra standardkurven.



**Figur 20: BSA standardkurve.** Eksempel på en standardkurve av BSA med kjent konsentrasjon.

## 4.6 Kvantitativ Real-Time PCR (qRT-PCR)

Kvantitativ Real-Time PCR (Kvantitativ sanntids-polymerasekjedereaksjon, qRT-PCR) er den mest følsomme og pålitelige teknikken for påvisning og kvantifisering av utvalgte mRNA transkripter i en prøve. Teknikken er følsom nok til å detektere en enkel kopi av et mRNA transkript i prøven. Samtidig er teknikken veldig følsom for eksperimentelle feil hvis ikke den utføres nøyaktig. For å redusere risikoen for eksperimentelle feil bør kun løsninger og reagenser som er testet å være fri for forurensninger, som kan forstyrre analysen, benyttes. Reaksjonen består av to trinn ved bruk av to ulike enzymer. Første trinn for qRT-PCR er syntese av cDNA (komplementært DNA) fra mRNA (messenger RNA) ved bruk av enzymet revers transkriptase (RT). Det neste trinnet i metoden er amplifikasjon (mangfoldiggjøring) av utvalgte transkripter av cDNA fra relativt små mengder av utgangsmaterialet ved bruk av DNA-polymerase.

Etter morfologisk observasjon av celler som ble studert for å undersøke effekt av cystein på differensiering av myoblaster til myotuber (eksperiment med differensiering), ble det kjørt kvantitativ sanntids-PCR for å undersøke om det var en forskjell i ekspresjon av differensieringsmarkører mellom celler behandlet med lav cystein og celler behandlet med høy cystein fra dag 0 av differensiering. qRT-PCR ble også brukt for å måle konsentrasjon av DNA i prøver som var behandlet med cysteintitreringsmedium fra dag 3 av differensiering

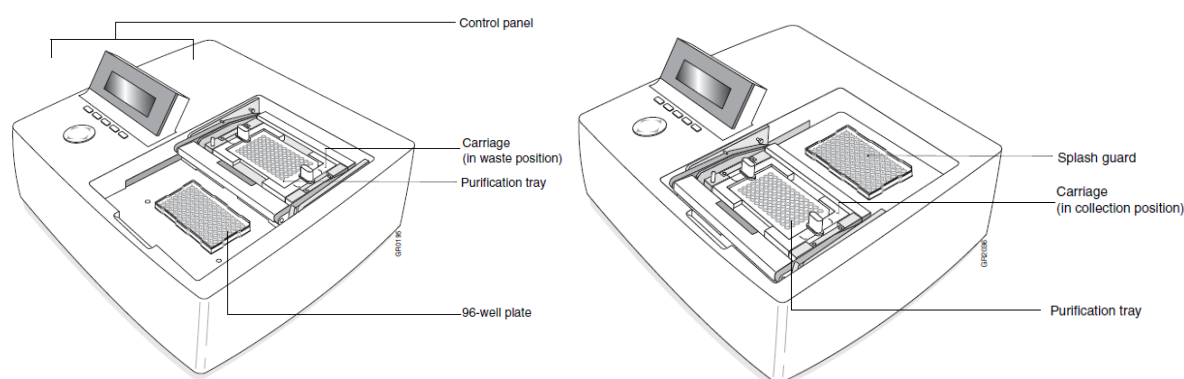
for å undersøke om cystein hadde effekt på lagring av lipiddråper i ferdigdifferentierte myotuber (eksperiment med lipiddråpeakkumulering). Begge eksperimentene ble kjørt med 3 uavhengige forsøk hvor hvert forsøk inneholdt 3 separate prøver.

#### 4.6.1 Høsting av prøver

For å utføre qRT-PCR ble celler sådd ut i 12-brønnersbrett som beskrevet under celledyrking. For å høste cellene på dag 5 eller 7, ble gammelt medium fjernet og cellene ble vasket 2 ganger med 1 ml PBS. Cellene ble lysert ved å pipettere 500 µl lyseringsbuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, fortynnet 1:1 med kalsium- og magnesiumfritt PBS) i hver brønn. Etter et par minutter ble løsningen i hver brønn pipettert opp og ned flere ganger (ca. 5-10 ganger) for å være sikker på å få lysert alle cellene (homogenisere) og prøvene ble overført til hvert sitt Eppendorfrør. Prøvene ble lagret ved -80° C inntil RNA-isolering.

#### 4.6.2 Isolering av total RNA

Prøvene ble tint på is. Instrumentet (Nucleic Acid PrepStation, ABI Prism® 6100) ble satt opp ved å sette en sprutbeskyttelsesplate (Splash Guard) i avfallsrommet (Waste), PCR-rør i oppsamlingsrommet (Collection) og en RNA-rensbrett (Total RNA Purification Tray) i den mobile delen (Carriage) (Figur 21).



**Figur 21: Oppsett av ABI Prism® 6100 instrument.** Figuren er hentet fra [60].

RNA ble isolert ved å følge «RNA Cell»-metoden på ABI 6100 trinn for trinn (Figur 22): Trinnene 1-7 ble utført over avfallsrommet (Waste). Deretter ble den mobile delen (Carriage) flyttet over oppsamlingsrommet (Collection).

Brønnene i RNA-rensbrett ble fuktet med 80 µl RNA Wash Solution 1 for å forebygge tetning av brønner og F1-knappen (Start) ble trykket. (F1-knappen på instrumentet trykkes

som startknapp etter hvert trinn i denne prosedyren for å påføre vakuum som sugde væsken gjennom brønnene og for å gå til neste trinn).

Hver prøve ble overført til sin brønn på RNA-rensbrett og vasket med 500 µl RNA Wash Solution 1. Prøvene ble vasket med RNA Wash Solution 2 tre ganger (1. gang med 400 µl, 2. gang med 400 µl og siste gang med 300 µl RNA Wash Solution 2). Pre-elueringsvakuum ble påført ved å trykke på F1 (Start). Rensbrettet ble løsnet opp og ristet (Touch Off) på Waste for å bli kvitt de siste dråpene med vaskeløsninger i avfallsrommet. Rensbrettet ble fraktet over Collection og prøvene ble eluert i Collection med 150 µl Nucleic Acid Purification Elution Solution. Rensbrettet ble løsnet opp og ristet på Collection (Touch Off) for å få ned de siste dråpene med eluerte prøver i hvert sitt PCR-rør.

Run the RNA Cell method

- a. In the Method View window, ensure that the highlighter is at step 1 of the RNA Cell method.
- b. Pre-wet wells of the Total RNA Purification tray, transfer the samples from the 96-well cell culture plate into the Total RNA Purification tray, preform washes and elution as described below.

Step	Description	Volume (µL)	Position	Time (sec)	Vacuum (%)	Action
—	Pre-wet wells with RNA Purification Wash Solution 1.	40	Waste	—	—	—
1	Load samples.	10-650*	Waste	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
2	Add RNA Purification Wash Solution 1.	500	Waste	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
3	Add RNA Purification Wash Solution 2.	400	Waste	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
4	Add RNA Purification Wash Solution 2.	400	Waste	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
5	Add RNA Purification Wash Solution 2.	300	Waste	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
6	Pre-Elution Vacuum.	—	Waste	300	90	Press <b>F1</b> (Start)
7	Touch Off at Waste.	—	Touch Off	—	—	Press <b>F1</b> (Start)
8	Add Nucleic Acid Purification Elution Solution.	150	Collection	120	20	Press <b>F1</b> (Start)
9	Touch Off at Collection.	—	Touch Off	—	—	Perform Touch Off

\*Multiple aliquots of lysate may be loaded to the purification tray well if necessary. However, care should be taken to ensure that the purification tray membrane does not become overloaded and prevent the flow of wash solutions.

- c. Clear the instrument.
- d. Save the RNA archive plate. Store it at -15 to -25 °C until needed.

**Figur 22: Fremgangsmåte for isolering av total RNA på ABI Prism® 6100.** Figuren er hentet fra [61].

Etter isolering ble RNA-prøvene satt umiddelbart på is for å minimere degradering av RNA. Prøvene ble lagret ved -80 °C inntil RNA-kvantifisering.

### 4.6.3 Kvantifisering av RNA

Før cDNA-syntese kan utføres, skal konsentrasjon av RNA i prøvene måles slik at mengde prøve som skal brukes til cDNA-syntese blir beregnet ut fra disse konsentrasjoner. RNA-prøvene ble tint på is. RNA ble kvantifisert på instrumentet NanoDrop-1000. Det er viktig at

den svarte optiske kabelen på instrumentet ikke berøres. Den grå metallarmen skal brukes isteden for å heve eller synke kabelen på plass (Figur 23).

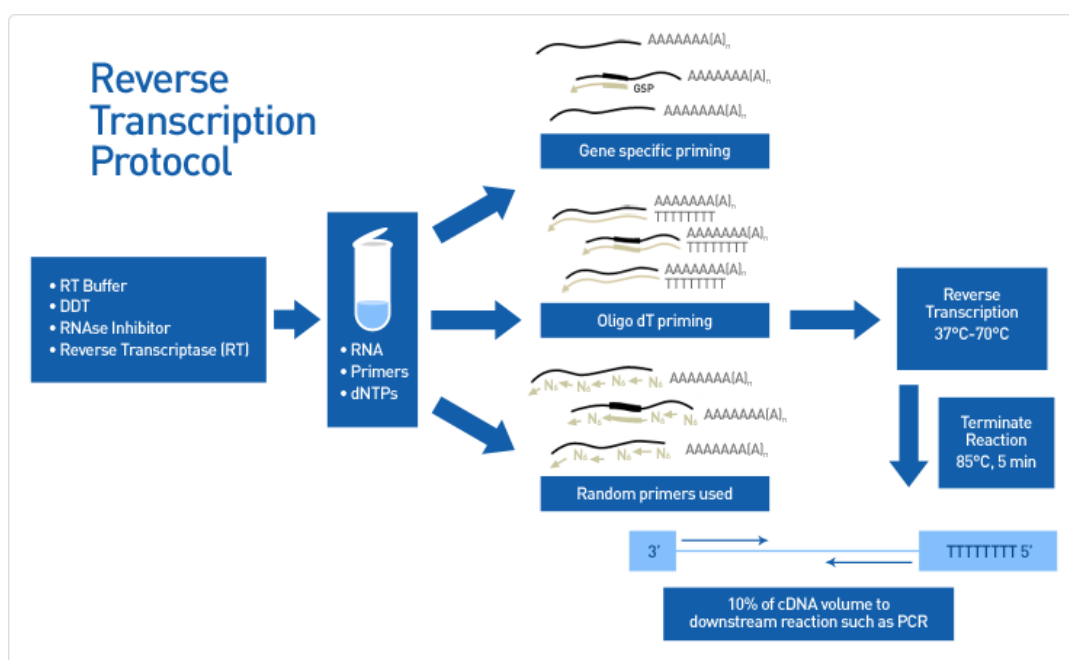


**Figur 23: Illustrasjon av bruksanvisning til NanoDrop-1000.** Figuren er hentet og modifisert fra [62], [63] og [64].

NanoDrop-programvaren (ND-1000, v3.8.1) ble åpnet på datamaskinen og måling av nukleinsyrer ble valgt. Sokkelen på NanoDrop ble vasket med MilliQ vann og filterpapir som er laget for objektiver. 1,5 µl RNase-fritt vann ble pipettert direkte til sokkelen, sokkelen ble synket og det ble klikket på "Ok" på PC-skjermen for å starte apparatet. Prøvetype ble justert til "RNA-40". Dette endrer faktoren som beregner RNA konsentrasjon basert på målt absorbans. Sokkelen ble løftet og 1,5 µl av Nucleic Acid Purification Elution Solution som ble brukt som elueringsmiddel under isolering av RNA ble pipettert til sokkelen, sokkelen ble synket og det ble klikket på "Blank" på PC-skjermen for å nullstille bakgrunnen for alle bølgelengder. Væsken ble tørket av med filterpapir. For å få homogene prøver ble RNA-prøvene blandet grundig ved å pipettere opp og ned flere ganger med en 100 µl pipettespiss. 1,5 µl av hver prøve ble pipettert på sokkelen, en og en av gangen, og det ble klikket på «Measure» for å måle RNA-konsentrasjon i prøvene. Mellom hver prøve ble sokkelen tørket med filterpapir. RNA-renhet blir angitt av forholdet mellom 260 og 280 nm. En ratio under 2,0 for RNA indikerer forurensning med proteiner og/eller fenoler. For en ren RNA-prøve eluert med den benyttede elueringsbufferen er det testet at forholdet bør være ~2,1. Prøvene ble satt umiddelbart igjen på is etter konsentrasjonsmåling og lagret igjen ved -80 °C inntil cDNA-syntese.

#### 4.6.4 Syntese av cDNA

Første trinn for qRT-PCR er syntese av cDNA fra mRNA ved bruk av enzymet revers transkriptase (RT). Til dette formålet ble enzymet SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase fra Invitrogen<sup>™</sup> brukt. Dette er et enzym som er optimalisert til å syntetisere enkelttrådig komplementært DNA fra total RNA. Hvert mRNA gir opphav til en lang sammenhengende cDNA når oligo dT(8)-primer (TTTTTTTT) blir brukt i reaksjonen, mens når en tilfeldig heksamerprimer (NNNNNN) blir brukt, gir alle typer RNA opphav til flere kortere cDNAer basert på fragmenter av opprinnelig RNA sekvens. En gen-spesifikk primer blir brukt dersom det er svært lave RNA-konsentrasjoner eller dersom genet man ønsker å studere er svært lavt uttrykket (Figur 24). Bruk av tilfeldig heksamerprimer foretrekkes siden denne teknikken er mindre utsatt for eksperimentelle feil forårsaket av RNA-degradering. Syntetisert cDNA brukes videre som templat til amplifisering av dobbeltrådet DNA under qRT-PCR.



**Figur 24: Protokol for revers transkripsjon.** Figuren er hentet fra [65].

RNA-prøvene og reagenser ble tint på is og mikset på virvelmikser. RNA-konsentrasjoner målt under kvantifisering av RNA ble brukt til å beregne volumet av RNA-prøve, som skulle brukes til cDNA-syntese (for å få 300 ng RNA per rør for forsøk med Sol8 celler og 150 ng RNA per rør for forsøk med C2C12 celler). Volum PCR-vann som skulle tilsettes til hver prøve i nye PCR-rør for å få totalvolum på 12 µl i hvert rør ble også beregnet.

Det ble laget en reaksjonsmiks i et Eppendorfrør etter følgende oppskrift (Tabell 8):



**Tabell 8: Oppskrift for reaksjonsmiks til cDNA syntese.**

<b>Reagens</b>	<b>Volum/rør (µl)</b>	<b>Volum [18 prøver + 2 kontroller + 10 %] (µl)</b>	<b>Funksjon</b>
H <sub>2</sub> O/PCR vann (RNase fritt)	0,75	16,5	Fortynningsmiddel
5x reaksjonsbuffer	4	88	Regulerer pH
0,1 M DTT (Ditiotreitol)	1	22	Stabiliserer enzymer og andre proteiner
50 µM tilfeldige heksamerer	1	22	Fungerer som primere for cDNA syntese
10 mM dNTPs (Deoksynukleotider)	1	22	Forebygger primer dimerdannelse før høy temperatur oppnås
SuperScript III enzym (RT enzym)	0,25	5,25 (Tilsettes etter at kontroll nr.1 uten RT enzym er tatt ut)	Omdanner mRNA til enkelttrådig cDNA
Total	8	175,75	

Før tilsetning av SuperScript III enzym til reaksjonsmiksen over, ble en prøve på 7,5 µl tatt ut og pipettert til første kontrollrør (kontroll nr. 1). Dette skulle brukes som en negativ cDNA reaksjon (reaksjon uten revers transkriptase enzym) for å kontrollere RNA-kvalitet (kontroll for DNA forurensninger). Til dette røret ble volumer fra tre tilfeldige RNA-prøver pipettert (hver med 1/3 av RNA konsentrasjonen brukt for RNA prøver) + 12 µl PCR-vann.

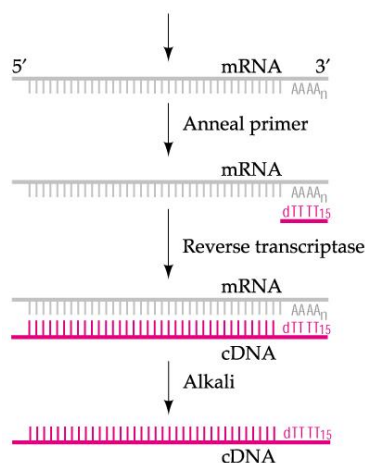
Etter beregning av volum RNA-prøve og volum PCR-vann, som skulle pipetteres til hvert rør, ble først riktig volum PCR-vann pipettert til hvert sitt PCR-rør. Deretter ble 8 µl reaksjonsmiks pipettert til hvert rør og til slutt ble riktig volum av hver RNA prøve pipettert til hvert sitt rør. Til det andre kontrollrøret ble ingen RNA-prøve pipettert (kontroll nr. 2).

Denne kontrollen ble brukt for å kontrollere reaksjonsmiksen.

Etter pipettering ble alle PCR-rør med prøve forseglet og mikset godt på virvelmikser.

Rørene ble satt inn i PCR maskin (Mastercycler Egradient S) og cDNA syntese (Figur 25) ble igangsatt med følgende innstillinger:

1. Annealings- og revers transkripsjonsfase: 50 °C for 60 minutter (Heksamerer (primere) binder seg til mRNA og revers transkriptase transkriberer en komplementær DNA-tråd (cDNA) med mRNA som templat.)
2. Enzyminaktiveringsfase: 72 °C for 15 minutter (Enzymet revers transkriptase inaktiveres ved høy temperatur.)
3. Avkjølingsfase: Romtemperatur inntil avkjøling (cDNA prøvene avkjøles til romtemperatur.)



**Figur 25: Metode for syntese av cDNA.** Figuren er hentet fra [66].

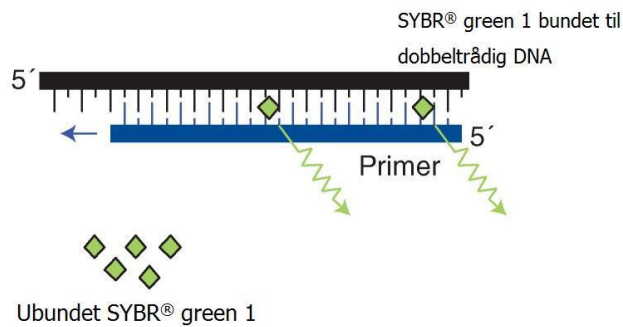
Etter avkjøling ble cDNA-prøvene lagret ved -20 °C inntil qRT-PCR. For lengre oppbevaring skal prøvene lagres ved -80 °C.

#### 4.6.5 Kvantitativ sanntids-PCR (qRT-PCR)

Det neste trinnet for qRT-PCR (kvantitativ sanntids polymerasekjedereaksjon) er amplifikasjon (mangfoldiggjøring) av utvalgte transkripter av cDNA (bestemte DNA-sekvens) i en polymerasekjedereaksjon, katalysert av DNA-polymerase. Under qRT-PCR blir kopier av et DNA templat generert eksponentielt (amplifikasjon), som resulterer i et kvantitativt forhold mellom mengde DNA templat i utgangspunktet og mengde PCR-produkt (amplikon) som er akkumulert etter hver syklus under reaksjonen.

#### Fluoriserende teknologi

Det finns to generelle teknologier for detektering av mengde amplikon som akkumuleres. Den første er dobbelttrådet DNA-interkalerende fluoriserende molekyler som SYBR<sup>®</sup> Green 1, og den andre er fluoriserende prober som TaqMan probe. SYBR<sup>®</sup> Green 1 teknologi benytter seg av to primere, tilsvarende en vanlig PCR, som vil amplifisere et kort DNA sekvens [80-120 bp (basepar)]. SYBR<sup>®</sup> Green 1 er et fluorescerende fargestoff som fluorescerer kun når det er interkalert inn i dobbelttrådet DNA-molekyl (dsDNA) (Figur 26). Intensiteten til fluorescens signal er derfor avhengig av mengde dsDNA som finns i reaksjonen. Ulempen med denne metoden er at den er ikke spesifikk for en bestemt DNA-sekvens siden fargestoffet binder seg til alle dsDNAer som dannes under PCR-reaksjonen, men fordelen er at den kan brukes med hvilken som helst primerpar og på hvilken som helst targetsekvens, noe som gjør metoden relativt enkel og kostnadseffektiv [67].



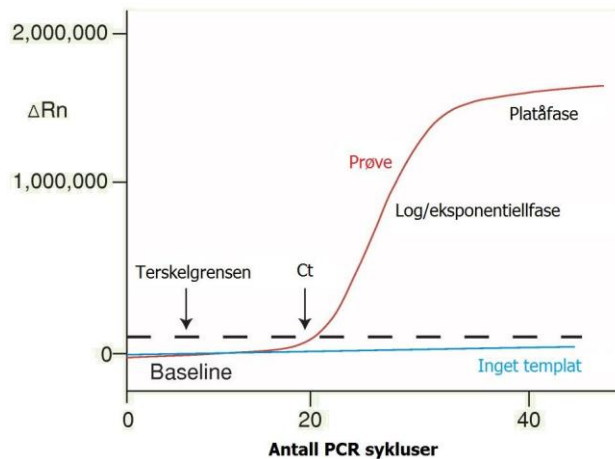
**Figur 26: SYBR® Green 1.** SYBR® Green 1 fluorescerer kun når det er interkalert inn i dobbeltrådet DNA-molekyl (dsDNA). Figuren er hentet og modifisert fra [67].

TaqMan teknologi består av to primer, tilsvarende som for CyberGreen, men inneholder også en probe som er komplementær til DNA-sekvens mellom disse to primerne. Proben har et fluorescerende resposmolekyl bundet til 5'-enden og et fluorescensslukkende molekyl bundet til 3'-enden, som danner et donor-akseptor-par basert på FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) prinsipp. Denne teknologien er mer spesifikk, men siden den krever amplikonspesifikke prober, er dette en vesentlig dyrere detekteringsmetode. I denne oppgaven ble det benyttet SYBR® Green 1 teknologi, som er den enkleste og mest kostnadseffektive metoden for detektering av mengde DNA-produkt som akkumuleres under PCR-reaksjon [67].

### Deteksjon av PCR-produkt

Uavhengig av fluorescensteknologi som benyttes vil intensiteten til emittert fluorescens som akkumuleres være proporsjonal med mengde DNA-produkt (amplikon) som dannes under qPCR (Fluorescens øker eksponentielt når DNA-templat amplifiseres). Amplifiseringen plottes med antall PCR sykluser på x-aksen og mengde fluorescens produsert eller  $\Delta R_n$  på y-aksen (Figur 27).  $\Delta R_n$  er en verdi beregnet av dataprogrammet som er lik fluorescensemisjon av produktet til enhver tid minus fluorescensemisjon fra baseline. Under de første syklusene overstiger ikke  $\Delta R_n$ -verdier baseline. Terskelgrensen er en verdi som beregnes av datamaskinen basert på variabiliteten av baseline. Ved dette punktet er fluorescens emittert av PCR-produkt høyere enn bakgrunnsfluorescensen (bakgrunnsstøy) og øker lineært for hver syklus. Antall sykluser som trengs for at fluorescensen for en prøve sammenfaller med terskelverdien angis som terskelsyklusen ( $C_t$ ). En høy konsentrasjon av et templat i prøven (RNA omgjort til cDNA) fører til at det trengs færre sykluser før fluorescensen krysser terskelverdien og dermed får produktet en lav  $C_t$ -verdi. Templater som finnes i mindre

konsentrasjoner trenger flere PCR sykluser før de krysser terskelverdien, og får derfor en høyere Ct-verdi [67]. Forskjeller i Ct-verdiene benyttes til å bestemme differansen i konsentrasjonen av den opprinnelig mengden templatet fra ulike prøver.



**Figur 27: Modell av et enkelt amplifiseringsplott fra qPCR.** Figuren er hentet og modifisert fra [67].

Akkumuleringen skjer i tre faser: Baselinefase, eksponentiellfase og platåfase.

Under baselinefasen, som vanligvis er fra syklus 3 til syklus 15, er en mengde amplikon og dermed fluorescens akkumulert, men fluorescensen er under instrumentets deteksjonsgrenser og/eller bakgrunnsfluorescens fra reagensene i blandingen. Under den eksponentielle fasen øker fluorescens eksponentielt med mengde amplikon (PCR-produkt/cDNA-produkt) som er produsert (produkt dobles ved hver syklus), frem til platåfasen hvor det er lite eller ingen økning i PCR-produkt og grafen flater ut på grunn av inhibering og/eller at reaksjonskomponenter blir oppbrukt [67]. Instrumentet beregner en optimal terskelverdi tidlig i den eksponentielle fasen, som brukes til å fastsette Ct-verdi for hver enkelt prøve.

### Fremgangsmåte

I denne oppgaven ble det kjørt qRT-PCR på diverse gener som er viktige for differensiering av myoblaster til myotuber (differensieringsmarkører) (vedlegg 9.5) ved hjelp av SYBR Green metoden.

Til dette formålet ble det brukt KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Kit med Master Mix Universal fra KAPA Biosystems. Mastermiksen er klar til bruk og inneholder SYBR<sup>®</sup> Green 1 fluorescerende fargestoff, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs og stabilisatorer. cDNA-prøver og reagenser ble tint på is og mikset på virvelmikser. Det ble laget to negative kontroller; en uten cDNA (kun mastermiks med PCR-vann) for å kontrollere mastermiksen, og en uten mastermiks (kun

cDNA med PCR-vann) for å kontrollere mRNA forurensninger. Det ble laget en av hver kontroll til hvert gen som ble analysert. En qRT-PCR reaksjonsmiks ble laget for hvert primersett (forward og reverse) etter oppskriften (Tabell 9) og hver reaksjonsmiks ble blandet godt med multipipette. cDNA-prøver ble fortynnet 5x med PCR vann og 2,5 µl av disse ble brukt i hver reaksjon.

**Tabell 9: qRT-PCR reaksjonsmiks.**

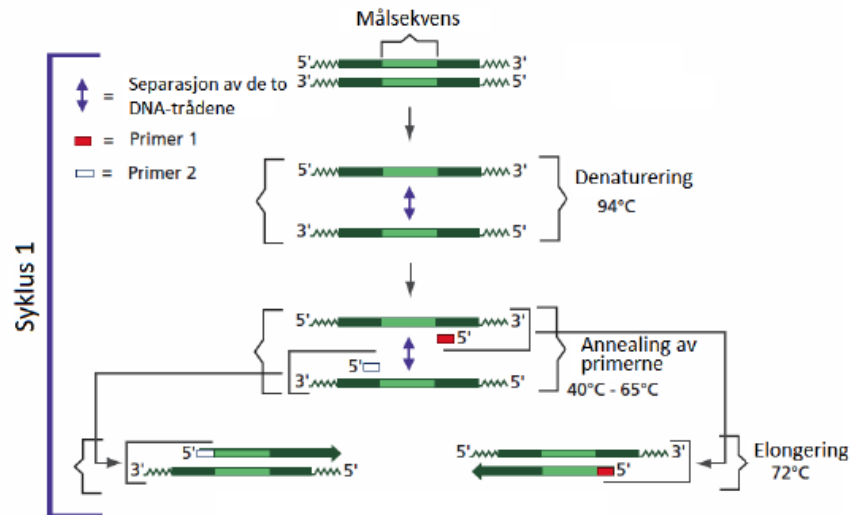
Reagens	Volum/reaksjon (µl)
SYBR Green Master Mix	5,0
PCR vann	2,3
5' og 3' primer (10 µM)	0,2
Total	7,5

Først ble riktig volum reaksjonsmiks pipettert til hver sin brønn i MicroAmp<sup>TM</sup> 96-brønners optisk PCR-reaksjonsplate. Deretter ble 2,5 µl cDNA prøve pipettert til hver sin brønn (totalvolum 10 µl per brønn). (Dette ga en cDNA sluttkonsentrasjon på 6 ng/µl for Sol8-celler og 3 ng/µl for C2C12-celler.) Etter at alt var pipettert, ble PCR-platene forseglest med MicroAmp<sup>TM</sup> optiske selvklebbende film, som ble klistret grundig på platen rundt alle brønnene. Innholdet i brønnene ble mikset godt på virvelmikser og spunnet ned ved 1000 rpm i 1 minutt. Platene ble plassert inn i ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System en av gangen, og maskinen ble startet med SDS 2,3-programvaren.

Selve qRT-PCR-reaksjonen som skjer i PCR-maskinen, består av 3 trinn (Tabell 10) (Figur 28).

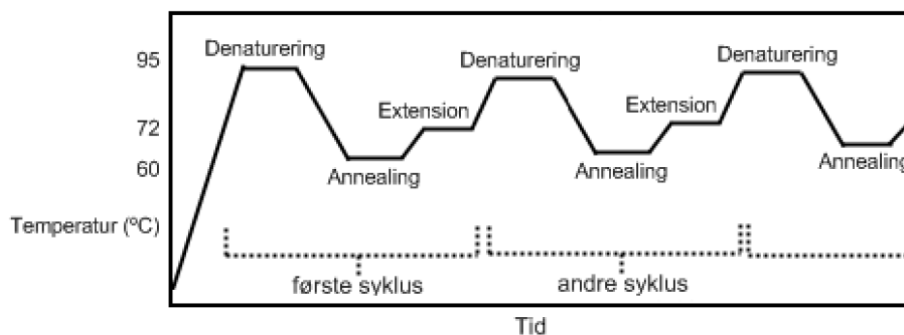
**Tabell 10: Trinnene under qRT-PCR-reaksjon.**

Trinn	Temperatur	Tid	Reaksjon
1. Enzym aktivering og initial denaturering	95 °C	3 minutter	Effektiv aktivering av DNA-polymerase, dannelse av dobbeltrådet templat-DNA og initiering av denaturering.
2. Denaturering	95 °C	10 sekunder	Denaturering av dobbeltrådet templat-DNA til enkelttrådet DNA.
3. Annealing og elongering	60 °C	20 sekunder	Annealing/binding av primere til deres target sekvenser. DNA polymerase hekter på dNTPs til 3' enden av primer for syntetisering av dobbeltråd DNA.



**Figur 28: Trinnene i en PCR-syklus.** Figuren er hentet fra [68].

Disse tre trinnene gjentas under hver syklus. Et qRT-PCR-forløp består vanligvis av 20-40 sykluser hvor det skjer en dobling av antall DNA-molekyler for hver runde inntil platåfasen nås [69] (Figur 29).



**Figur 29: Diagram av temperatursykluser i en qRT-PCR reaksjon.** Figuren er hentet fra [70].

#### 4.6.6 Analyse av qRT-PCR data

Det finns flere metoder for analysering av qRT-PCR data, for å kvantifisere mRNA som var tilstede i prøvene, ved å ta utgangspunkt i utgangsmaterialet til PCR (mengde cDNA ved begynnelsen av qRT-PCR): De vanligste er absolutt kvantifisering og relativ kvantifisering. Ved absolutt kvantifisering brukes mRNA med kjent konsentrasjon for å lage en standardkurve og konsentrasjon av prøver blir estimert ut fra standardkurven. Relativ kvantifisering, som også kalles for komparativ terskelmetode, bruker matematiske ligninger

for å beregne relativ mengde av RNA i forhold til en referansekontroll (endogenkontroll), som også kalles for et «housekeeping» gen [67].

I denne oppgaven ble det brukt TATA-bindende proteinet [71] TBP som endogenkontroll og relativ uttrykk av RNA ble beregnet etter nedenstående formel, hvor  $\Delta\Delta C_t$  er resultater fra qRT-PCR:

$$\text{Relativ forskjell} = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-\Delta C_t \text{ endogen control} - \Delta C_t \text{ prøve}}$$

Ved måling av DNA konsentrasjon i prøver [eksperiment med lipiddråpeakkumulering (Figur 18)] ble absolutt kvantifisering benyttet ved å lage en standardkurve med kjent konsentrasjon av DNA isolert fra mus (laget med 10 gangers fortynning fra 10 ng – 1 pg DNA) til å beregne mengde DNA i celleprøvene. Prøvene ble fortynnet 100 ganger og hver prøve ble målt 3 ganger.

## 4.7 Isolering av lipiddråper

Lipid dråper er dynamiske celleorganeller som består av en kjerne med nøytrale lipider omkranset av enkelt fosfolipidlag med forskjellige proteiner på overflaten. Lipiddråper finns i de fleste cellekulturer, spesielt når celler er sådd ut i medium tilsatt serum eller eksogene fettsyrer. Lipiddråper har en lavere egenvekt enn andre cellekomponenter grunnet det relativt lave proteininnholdet i forhold til den nøytrale lipidkjernen, og kan derfor lett isoleres ved sentrifugering. En kortvarig lavhastighets sentrifugering kan flyte lipid dråper raskt på overflaten, men andre cellemembraner og spesielt mitokondrier kan følge med lipiddråpene. Metoden brukt her, som ble utført ved tetthetsgradient ultrasentrifugering, gir en renere lipiddråpefraksjon med minimal forurensning [72].

Formålet med lipiddråpeisolering er å kunne bruke lipiddråpene analytisk til å studere lipidkomponenter ved tynnsjikt-kromatografi (TLC) eller å studere proteinene på lipiddråpene ved Western blotting.

### 4.7.1 Høsting av prøver i 75 cm<sup>2</sup> petriskål

1 M Tricin-stock (vedlegg 9.6.1), 5x Buffer A (vedlegg 9.6.2) og PBS med Complete (vedlegg 9.6.5) ble laget. (Tricin er en buffer som regulerer pH. Buffer A, Buffer B med sukrose (vedlegg 9.6.4) og Buffer B uten sukrose (vedlegg 9.6.3) brukes for å danne en

tetthetsgradient slik at lipiddråpene som flyter på toppen gjennom de tre fasene blir renset optimalt.)

Alt arbeidet foregikk på is. Celler sådd ut i petriskål (fem petriskåler av hver cysteinkonsentrasjon brukt under cysteintitrering: 10 & 100  $\mu\text{M}$ ) ble vasket to ganger med 10 ml kald PBS. PBS var fjernet og cellene ble vasket en gang med 2 ml PBS + Complete. Hele væsken ble fjernet og cellene ble skrapet med en celleskraper. Celler fra hver prøve (fem petriskåler), som hadde et totalvolum på 1 mL, ble samlet og overført til et Eppendorfrør. En Complete Mini tablett ble løst i 250  $\mu\text{l}$  5x Buffer A og tilsatt hver prøve. Prøvene ble lagret ved  $-80^{\circ}\text{C}$  inntil isolering av lipiddråper.

#### **4.7.2 Isolering av lipiddråper**

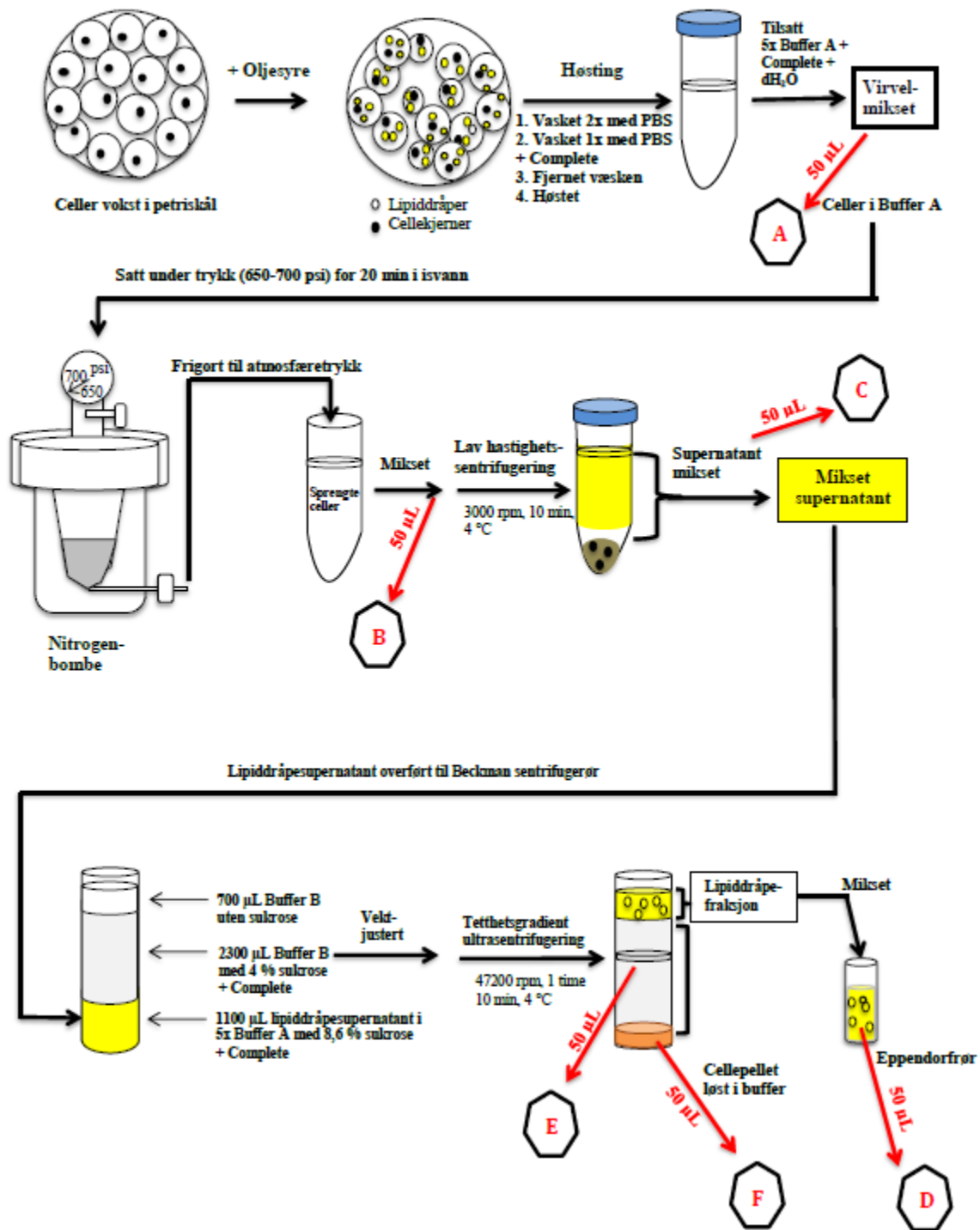
Prøvene fra Eppendorfrør (totalt 1,250  $\mu\text{l}$  av hver prøve) ble overført til hvert sitt sentrifugerør. Eppendorfrørene ble skylt med 350  $\mu\text{l}$  av 5x buffer A og væsken ble overført til hvert sitt rør. 80  $\mu\text{l}$  av 25x Complete stock ble tilsatt hvert rør. Til sist ble 570  $\mu\text{l}$  vann tilsatt hvert rør. Rørene ble mikset på virvelmikser og en prøve på 50  $\mu\text{l}$  ble tatt fra hvert Eppendorfrør, overført til nye Eppendorfrør og ble merket «**A**» (prøven før nitrogenkavitasjon). Resten av prøven ble overført til nitrogenbombe (en prøve av gangen). Bomben ble lukket godt, satt på is og  $\text{N}_2$ -gass fra nitrogentank ble overført ved 650-700 psi (pounds per square inch) for 20 minutter (Figur 30). Under denne inkuberingen vil nitrogen med høyt trykk trenge inn i cellene. Prøveløsningen ble så frigjort dråpevis fra nitrogenbombekammeret tilbake til hvert sitt sentrifugerør i vanlig trykk via et utløp. Når cellene kommer raskt under atmosfærisk trykk vil gassen utvide seg og sprekke cellene, som er en skånsom og effektiv måte for lysering av celler, samtidig som lipiddråpene holdes intakt. Mellom hver prøve ble nitrogenbombekammeret vasket grundig to ganger med destillert vann og nitrogengasstrykk. Etter lysering ble de sprenge cellene virvelmikset og det ble tatt en ny prøve på 50  $\mu\text{l}$  fra hver prøve, overført til nye Eppendorfrør og merket «**B**» (prøven etter nitrogenkavitasjon). Resten av prøvene i sentrifugerør ble sentrifugert ved 3000 rpm for 10 minutter. I dette trinnet blir cellekjerner fjernet ved lav hastighetssentrifugering og faller ned i bunnen av røret som en pellet. Etter denne korte lavhastighetssentrifugeringen ble supernatanten fra hvert rør overført til nye rør og virvelmikset. Det ble tatt nye prøver på 50  $\mu\text{L}$  fra mikset supernatant av hver prøve, overført til nye Eppendorfrør og merket «**C**» (prøven før ultrasentrifugering). Resten av supernatantene (1100  $\mu\text{l}$ ) ble overført til hvert sitt Beckman ultrasentrifugerør. På toppen av denne fasen med høy sukrose (prøve i 5x Buffer A



med 8,6 % sukrose og Complete), ble 2300  $\mu\text{L}$  av en ny fase med middelshøy sukrose (Buffer B med 4 % sukrose og Complete) pipettert sakte og forsiktig uten å blande de to fasene. På toppen av disse to fasene ble 700  $\mu\text{L}$  av den siste fasen med ingen sukrose (Buffer B uten sukrose) pipettert sakte og forsiktig uten at de tre fasene ble blandet.

Vekten til Beckmanrørene ble balansert forsiktig på vekt to og to, og vekten ble justert likt ved å tilsette/ta ut mindre mengder av topplaget med pipette fra toppen av røret. Rørene ble lukket og hengt inn i Beckmanrotor. Rotoren ble satt inn i Beckman ultrasentrifuge og sentrifugert ved 47200 rpm for 1 time og 10 minutter. Under denne sentrifugeringen, som blir kalt for tetthetsgradient ultrasentrifugering, blir lipiddråpene som flyter på toppen gjennom de tre fasene med høy, middelshøy og ingen sukrose, renses optimalt. Toppene til et par mikropipetter ble kuttet med saks for å brukes til å pipettere de isolerte lipiddråpene med. Etter ultrasentrifugeringen ble lipiddråpefraksjonen på toppen av gradientene i hvert Beckmanrør overført til hvert sitt nye Eppendorfrør ved hjelp av de mikropipettene som var kuttet på toppen. Rørene ble virvelmikset og det ble tatt nye prøver på 50  $\mu\text{L}$  fra begge disse isolerte lipiddråpeprøvene, overført til nye Eppendorfrør og merket «**D**» (prøven etter ultrasentrifugering). Det ble også tatt en prøve på 50  $\mu\text{L}$  fra skillen mellom de to fasene som var dannet i Beckmanrørene etter ultrasentrifugering, overført til nye Eppendorfrør og merket «**E**» (prøven fra fasenes skille). Pelletene i hvert Beckmanrør ble løst i bufferen fra samme rør og en siste prøve på 50  $\mu\text{L}$  ble tatt fra disse, overført til nye Eppendorfrør og merket «**F**» (prøven fra pellet av celleforurensninger).

Alle disse prøvene på 50  $\mu\text{L}$ , som ble tatt underveis under hele prosedyren, inkludert selve lipiddråpene («**D**»), ble til slutt farget med Bodipy fortynnet med PBS, mikroskopert i fluorescensmikroskop og fotografert, slik at effekt av nitrogenkavitasjon på lysring av celler, og effekt av tetthetsgradient ultrasentrifugering på renhet av lipiddråper, kunne bli observert og prøvene 'før og etter' kunne bli sammenlignet.



**Figur 30: Skjematisk illustrasjon av lipiddråpeisoleringsteknikk.** Prøver på 50 µL ble tatt før og etter hvert trinn i prosessen slik at effekten av teknikkene nitrogenkavitasjon og tetthetsgradient ultrasentrifugering kunne bli observert under mikroskopering.

## 4.8 Statistiske analyser

Dataene i denne masteroppgaven er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM). For kvantifisering av triglyserider, proteiner og DNA er det utført tre uavhengige forsøk med tre paralleller per forsøk. For identifisering av differensieringsmarkører er det utført et forsøk for hver cellelinje med tre paralleller per forsøk. Ettersom disse cellene differensieres i 5-7 dager før høsting, kan disse ses på som uavhengige. Men for å verifisere disse dataene trengs disse forsøkene å repeteres to ganger til.

For å sammenligne forskjeller mellom lave cysteinkonsentrasjoner og den høyeste cysteinkonsentrasjonen ble statistiske analyser utført ved hjelp av tosidig uparet t-test i dataprogrammet Microsoft Excel 2010. Signifikansnivå benyttet i denne oppgaven var 0,05 og 0,01. Signifikante forskjeller mellom lave cysteinkonsentrasjoner og den høyeste cysteinkonsentrasjonen med p-verdi  $\leq 0,05$  er merket med \* og signifikante forskjeller med p-verdi  $\leq 0,01$  er merket med \*\*.

## 5 Resultater

### 5.1 Effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber

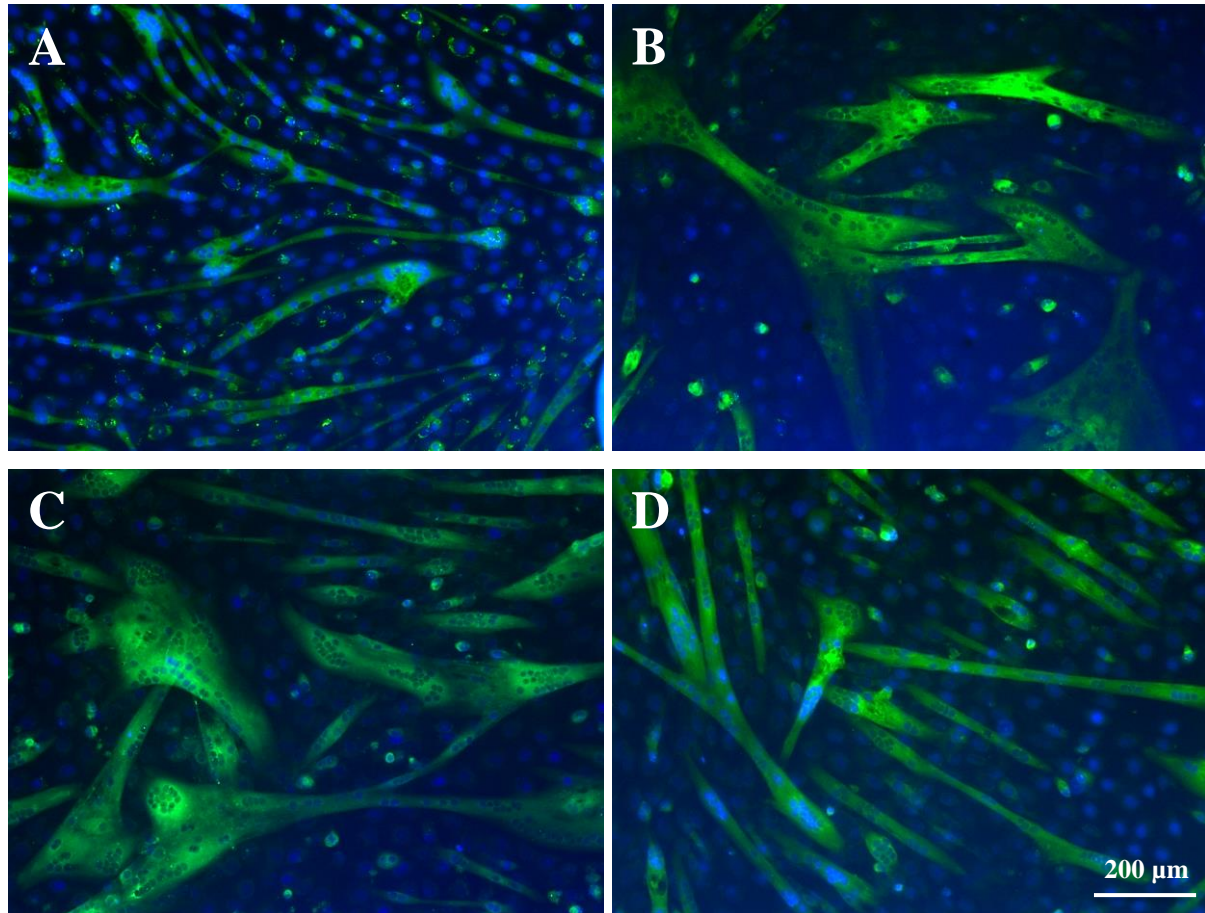
Et preliminært forsøk utført i gruppen hadde antydnet at det ble dannet færre lipiddråper i muskelceller som ble dyrket med lav cystein. For å undersøke denne observasjonen nærmere, ble to ulike muskelcellelinjer dyrket med lav cystein. Effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotubene ble observert både ved mikroskopering etter å ha farget lipiddråpene i fikserte celler med Bodipy (493/503) eller Oil Red O, og ved å måle triglyseridkonsentrasjon i prøvene ved hjelp av Triglycerides Enzymatique PAP 150-kit, proteinkonsentrasjon ved hjelp av Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit, og DNA-konsentrasjon ved hjelp av qRT-PCR.

I dette forsøket ble kontrollcellene behandlet med «vanlig differensieringsmedium» [differensieringsmediet med normal cysteinkonsentrasjon (400  $\mu$ M, vedlegg 9.1.5)] under hele differensieringen, mens testcellene ble behandlet med «cysteintitreringsmedier» [differensieringsmedier uten L-Metionin og L-Cystin i utgangspunktet, som ble tilsatt L-Metionin (vedlegg 9.1.6) til sluttkonsentrasjon på 30  $\mu$ M og økende mengder L-Cystin (vedlegg 9.1.7) til sluttkonsentrasjon på 5-100  $\mu$ M (vedlegg 9.1.9)] fra dag 5 av differensiering hos C2C12 celler og fra dag 3 av differensiering hos Sol8 celler. For observasjon av effekt ved mikroskopering, ble celler fra begge cellelinjer først sådd ut i petriskål med glassbunn for å kunne ta bilder med bedre oppløsning, men etter at cellene hadde differensiert i et par dager, løsnet cellene fra bunnen. Av den grunn ble nye celler sådd ut i 12-brønners brett med plastbunn for mikroskopering.

#### 5.1.1 Effekt i C2C12 celler ved mikroskopering

Dette forsøket ble utført for å observere morfologisk effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber fra C2C12-cellelinje ved hjelp av mikroskopering. Celler fra C2C12 cellelinje ble sådd ut i 12-brønnersbrett med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering ble det byttet til vanlig differensieringsmedium (vedlegg 9.1.5) i alle brønner (på dag 0 av differensiering). På dag 3 ble medier fornyet og på dag 5 ble det erstattet med cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) i brønner med testceller. Medier ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene.

Cellene ble stimulert til å lage lipiddråper med 400  $\mu\text{M}$  OA på dag 6, og på dag 7 ble de fiksert og farget med Bodipy (493/503) og DAPI som beskrevet under metoder. De ble så observert og fotografert i Zeiss Heating Units XLS fluorescensmikroskop (Figur 31).



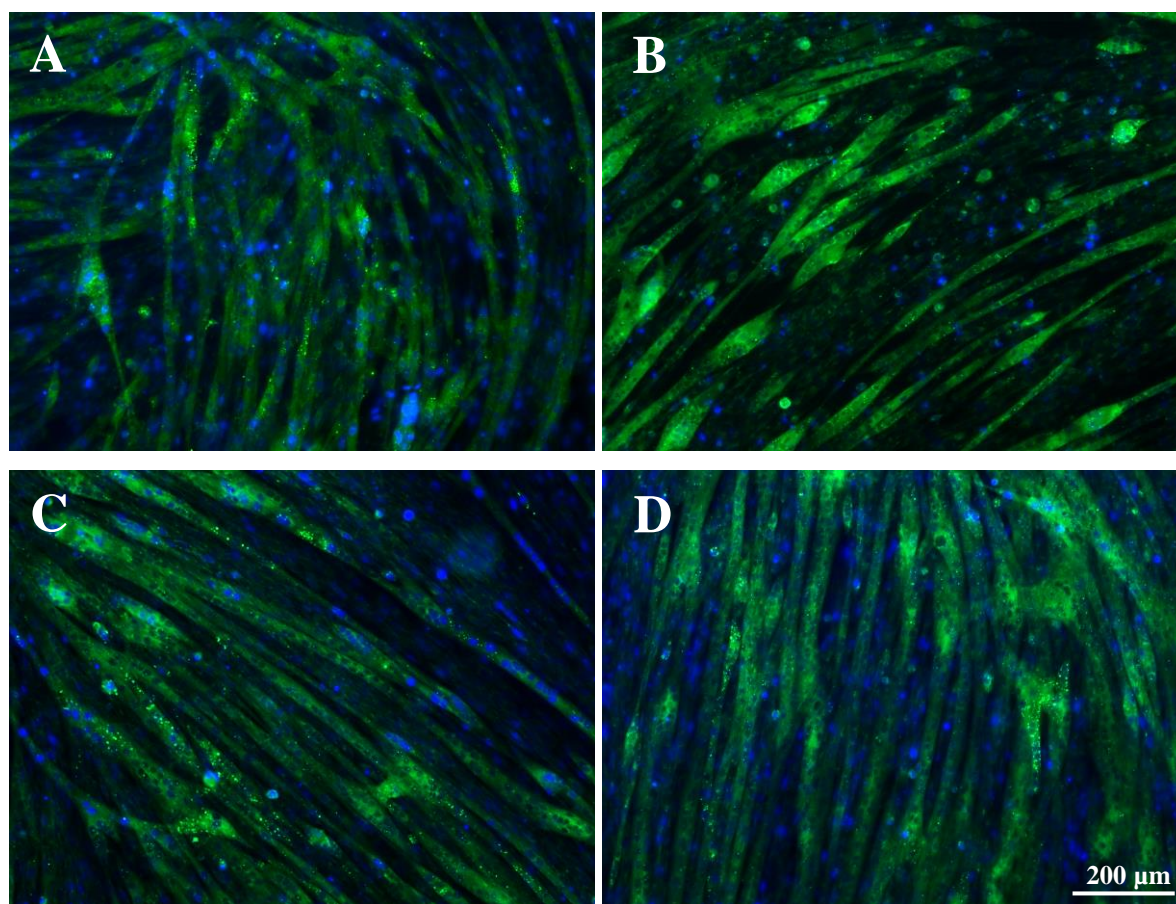
**Figur 31: Effekt av cystein på lagring av lipiddråper i C2C12 celler.** Ferdig differensierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller inkubert i 10  $\mu\text{M}$  cystein (B), 30  $\mu\text{M}$  cystein (C) og 100  $\mu\text{M}$  cystein (D) fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer (fra dag 6 til dag 7) før fiksering på dag 7, og farget med Bodipy (493/503) (farger lipiddråper grønt) og DAPI (farger cellekjerner blått) etter fiksering. Bildene er tatt med 10x objektiv.

Det viste seg at fargestoffet som ble benyttet til å farge lipiddråpene (Bodipy 493/503) ble samlet i store mengder i differensierte myotuber mens en punktvis merking av lipiddråper ble observert i myoblaster. Dette tyder på at den tilsatte fettsyren akkumulerte i LDer i myoblaster istedenfor i myotuber i C2C12 celler (Figur 31 A). Denne celletypen var av den grunn ikke godt egnet til dette studiet. Det ble derfor benyttet Sol8 celler videre i forsøkene for å studere denne effekten.



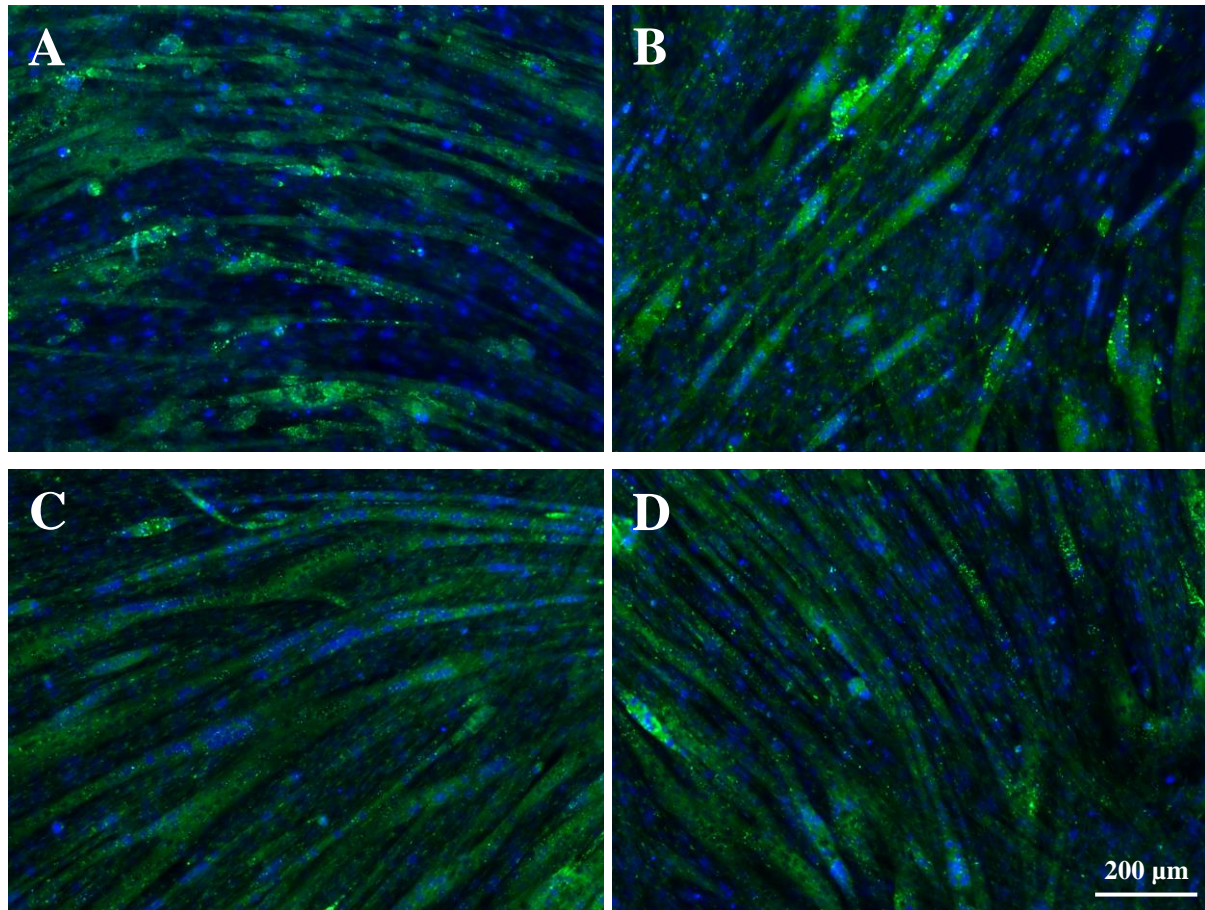
### 5.1.2 Effekt i Sol8 celler ved morfologisk observasjon

Dette forsøket ble utført for å observere morfologisk effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber fra Sol8-cellelinje ved hjelp av mikroskopering. Celler fra Sol8 cellelinje ble sådd ut i 12-brønnersbrett med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering ble det byttet til vanlig differensieringsmedium (vedlegg 9.1.5) i alle brønner (på dag 0 av differensiering). På dag 3 ble mediet erstattet med cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) i brønner med testceller. Medier ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene. Fra dag 4 ble cellene inkubert i cysteintitreringsmedier (ingen OA tilsatt), eller stimulert til å lage lipiddråper med 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  OA. På dag 5 ble de fiksert og farget med Bodipy (493/503) og DAPI, eller med Oil Red O som beskrevet under metoder. Celler farget med Bodipy (493/503) og DAPI ble så observert og fotografert i Zeiss Heating Units XLS fluorescensmikroskop (Figur 32, Figur 33 og Figur 34), og de farget med Oil Red O ble observert og fotografert i Olympus CKX41 lysmikroskop (Figur 35).



**Figur 32: Effekt av cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler uten forbehandling med OA.** Ferdigdifferensierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller inkubert i 10  $\mu\text{M}$  cystein (B), 30  $\mu\text{M}$  cystein (C) og 100  $\mu\text{M}$  cystein (D) fra dag 3 av differensiering. Cellene er farget med Bodipy (493/503) (farger lipiddråper grønt) og DAPI (farger cellekjerner blått) etter fiksering. Bildene er tatt med 10x objektiv.

Det ble ikke observert en merkbar forskjell i total mengde lipiddråper akkumulert i myotuber behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering uten forbehandling med OA (Figur 32).

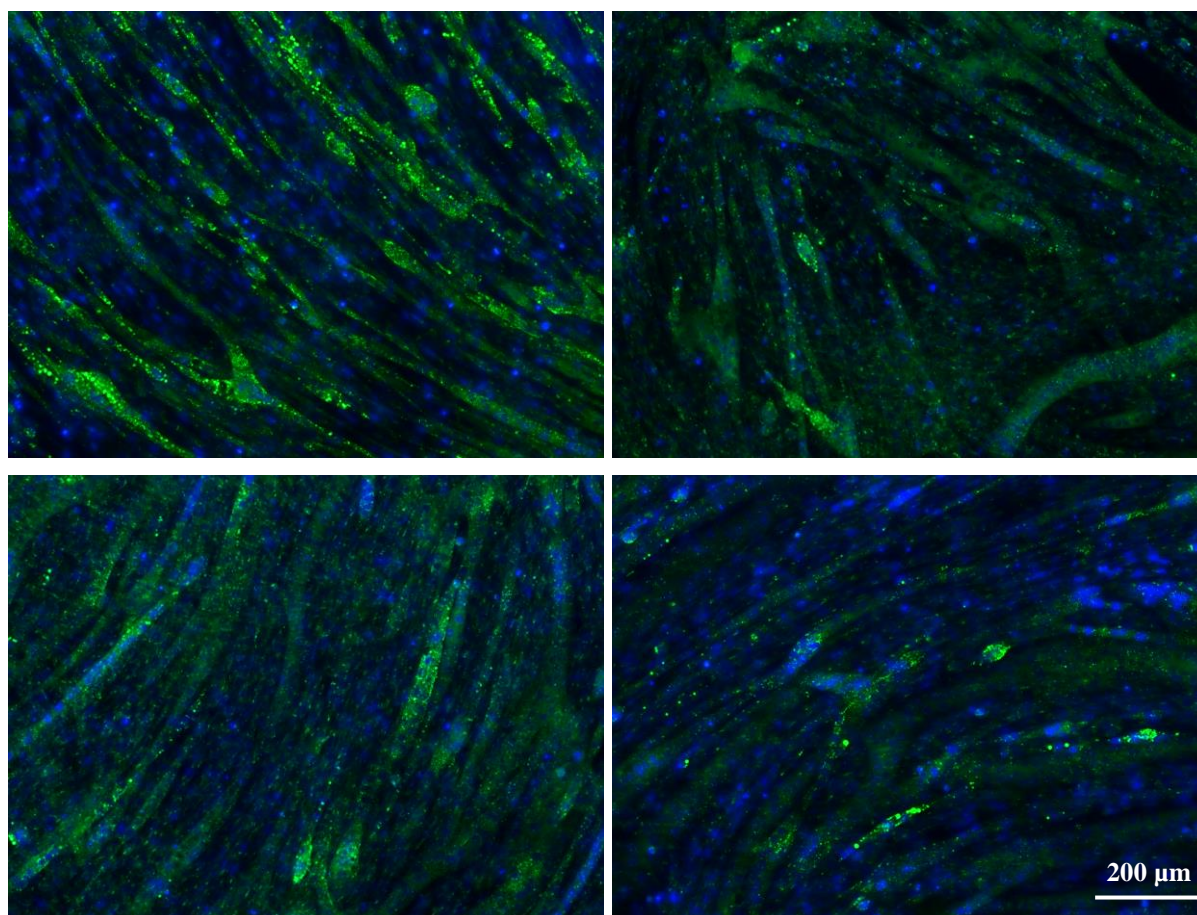


**Figur 33: Effekt av cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler forbehandlet med 100  $\mu$ M OA.**

Ferdigdifferensierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu$ M, og testceller inkubert i 10  $\mu$ M cystein (B), 30  $\mu$ M cystein (C) og 100  $\mu$ M cystein (D) fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 100  $\mu$ M OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før fiksering på dag 5, og farget med Bodipy (493/503) (farger lipiddråper grønt) og DAPI (farger cellekjerner blått) etter fiksering. Bildene er tatt med 10x objektiv.

Det ble ikke observert en merkbar forskjell i total mengde lipiddråper akkumulert i myotuber behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering ved forbehandling med 100  $\mu$ M OA heller (Figur 33).





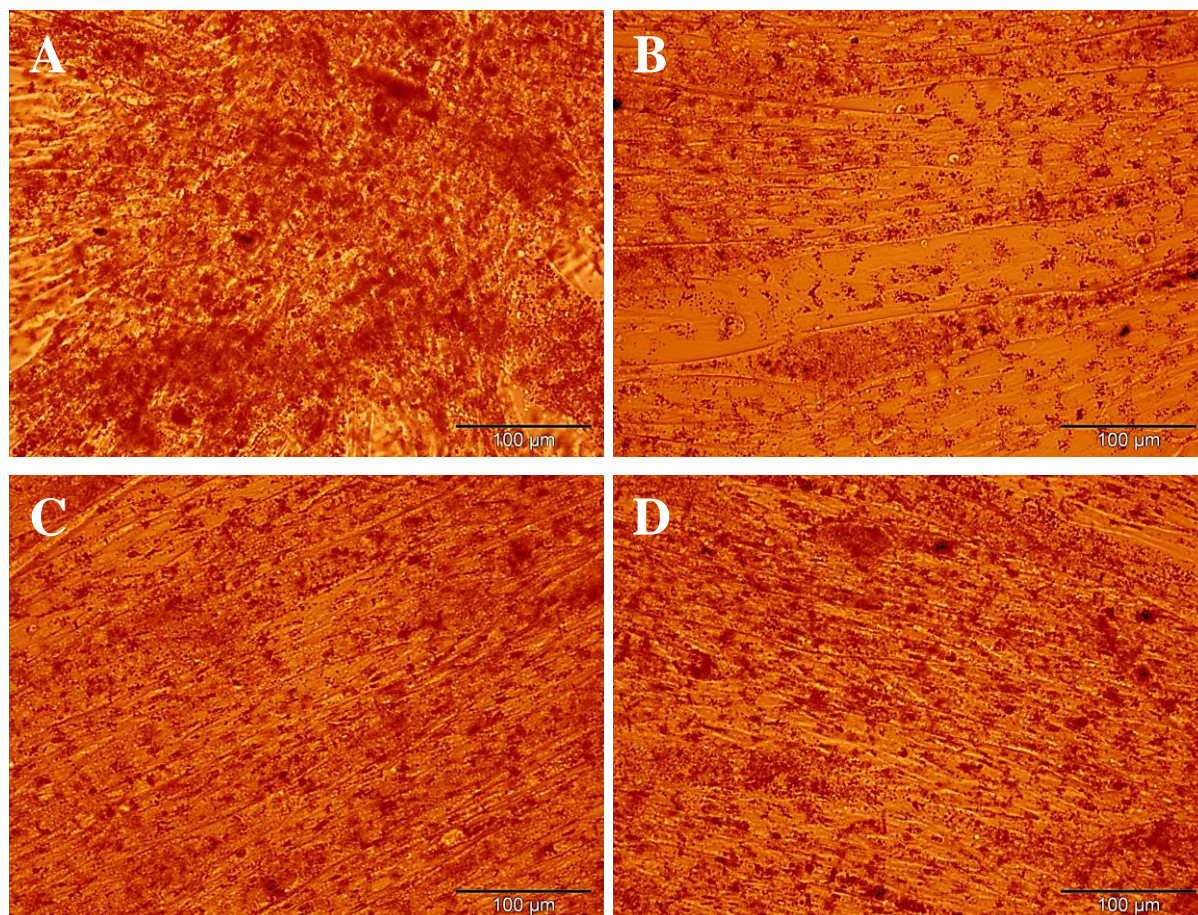
**Figur 34: Effekt av cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler forbehandlet med 400  $\mu$ M OA.**

Ferdigdifferensierte kontrollceller (**A**) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu$ M, og testceller inkubert i 10  $\mu$ M cystein (**B**), 30  $\mu$ M cystein (**C**) og 100  $\mu$ M cystein (**D**) fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu$ M OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før fiksering på dag 5, og farget med Bodipy (493/503) (farger lipiddråper grønt) og DAPI (farger cellekjerner blått) etter fiksering. Bildene er tatt med 10x objektiv.

Ved mikroskopering ble det ikke observert en merkbar forskjell i total mengde lipiddråper akkumulert i myotuber behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering ved forbehandling med 400  $\mu$ M OA heller (Figur 34). Uten tilgjengelig metode til å ha målt størrelsen til lipiddråpene, gav mikroskoperingen inntrykk av at det var flere og mindre lipiddråper i celler med lavest cysteinkonsentrasjon (**B**), mens litt færre og større lipiddråper i celler med høyest cysteinkonsentrasjon (**D**), men bekreftelse av denne effekten krever avanserte metoder som muliggjør måling av størrelse og kvantifisering av antall lipiddråper, for eksempel ved «live cell imaging». Også her var fargestoffet, som ble benyttet til å farge lipiddråpene (Bodipy 493/503), samlet i forholdsvis store mengder i differensierte myotuber noe som gav mye bakgrunn og gjorde observering av effekt på lipiddråper vanskelig. Nye celler ble derfor sådd ut i 12-brønnersbrett, differensiert og



stimulert med OA i 24 timer før fiksering på samme måte som før, og lipiddråpene ble farget med Oil Red O isteden etter fiksering (Figur 35).



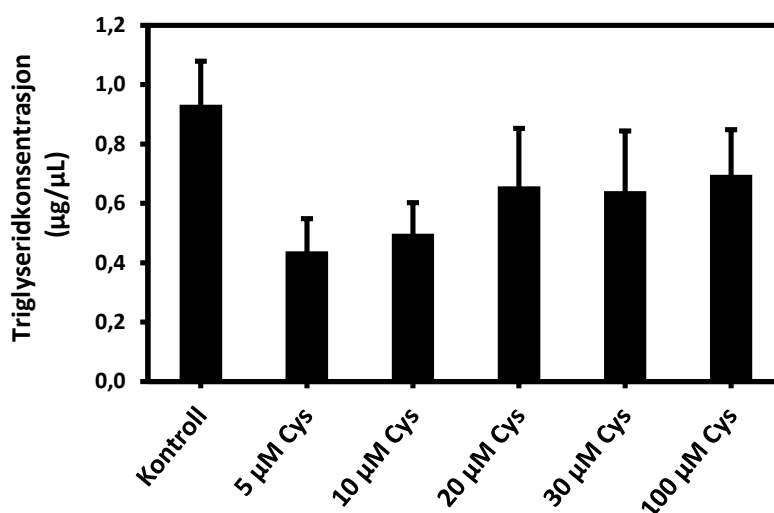
**Figur 35: Effekt av cystein på lagring av lipiddråper farget med Oil Red O i Sol8 celler forbehandlet med 400  $\mu$ M OA.** Ferdigdifferentierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu$ M, og testceller inkubert i 10  $\mu$ M cystein (B), 30  $\mu$ M cystein (C) og 100  $\mu$ M cystein (D) fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu$ M OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før fiksering på dag 5, og farget med Oil Red O (farger lipiddråper rødt) etter fiksering. Bildene er tatt med 40x objektiv.

Det ble observert flere lipiddråper i celler behandlet med 30  $\mu$ M cystein (C) og 100  $\mu$ M cystein (D) i forhold til celler behandlet med 10  $\mu$ M cystein (B), men det så imidlertid ut til å være flere differensierte myotuber i (C) og (D) i forhold til (B).

For å undersøke nærmere om lav cystein hadde effekt på lipiddråpeakkumulering i Sol8-myotuber ble det utført kvantifisering av triglyserider. I tillegg ble også proteiner og DNA kvantifisert for å finne ut om forandringer i mengde triglyserider med økende cysteinkonsentrasjoner skyldtes effekt av cystein på lipiddråpeakkumulering eller på proliferering /differensiering av celler.

### 5.1.3 Kvantifisering av triglyserider

Dette forsøket ble utført for å undersøke effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber fra Sol8-cellelinje ved hjelp av triglyseridkvantifisering. Celler fra Sol8 cellelinje ble sådd ut i 12-brønnersbrett med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering ble det byttet til vanlig differensieringsmedium (vedlegg 9.1.5) i alle brønner (på dag 0 av differensiering). På dag 3 ble mediet erstattet med cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) i brønner med testceller. Medier ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene. Etter 24 timer (dag 4) ble cellene stimulert til å lage lipiddråper med 400  $\mu\text{M}$  OA, og etter ytterligere 24 timer (dag 5) ble cellene høstet som beskrevet under metoder for å måle konsentrasjon av triglyserider i prøvene ved hjelp av Triglycerides Enzymatique PAP 150-kit (Figur 36).

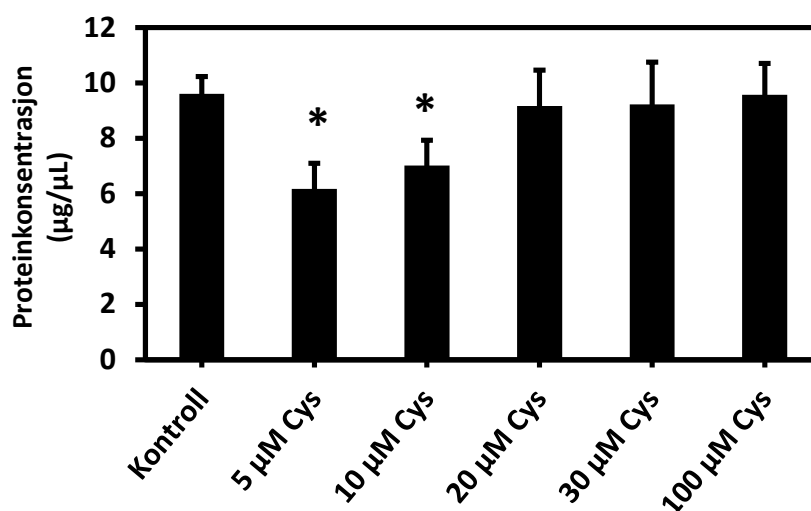


**Figur 36: Konsentrasjon av triglyserider.** Konsentrasjon av triglyserider i kontrollceller behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før høsting på dag 5. Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 uavhengige forsøk. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test.

Det var ikke en signifikant forskjell i triglyseridkonsentrasjon av testceller behandlet med lavere cysteinkonsentrasjoner sammenlignet med den høyeste konsentrasjonen på 100  $\mu\text{M}$ , men det ble imidlertid observert en gradvis økning av triglyseridkonsentrasjon med økende cysteinkonsentrasjoner (Figur 36). For å vite om økt cystein ga økt mengde lipiddråper uavhengig av en annen påvirkning av cellene, ble også mengde proteiner og DNA kvantifisert for å se om de ble påvirket av cysteinkonsentrasjonen.

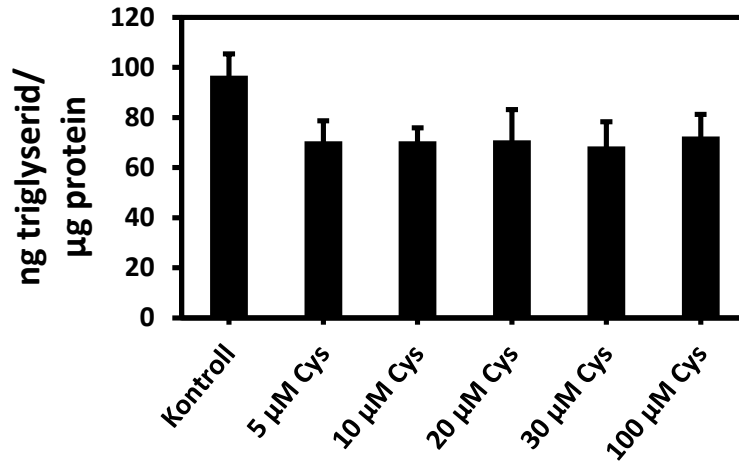
### 5.1.4 Kvantifisering av proteiner

Dette forsøket ble utført for å undersøke om mengde proteiner ble påvirket av cysteinkonsentrasjonen. Proteinkonsentrasjon ble målt på de samme prøvene som ble brukt til triglyseridkvantifisering, ved hjelp av Pierce® BCA Protein Assay Kit som beskrevet under metoder (Figur 37).



**Figur 37: Konsentrasjon av proteiner.** Konsentrasjon av proteiner i kontrollceller behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400 µM, og testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400 µM OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før høsting på dag 5. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM for 3 uavhengige forsøk. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  for konsentrasjonene 5 og 10 µM mot 100 µM cystein.

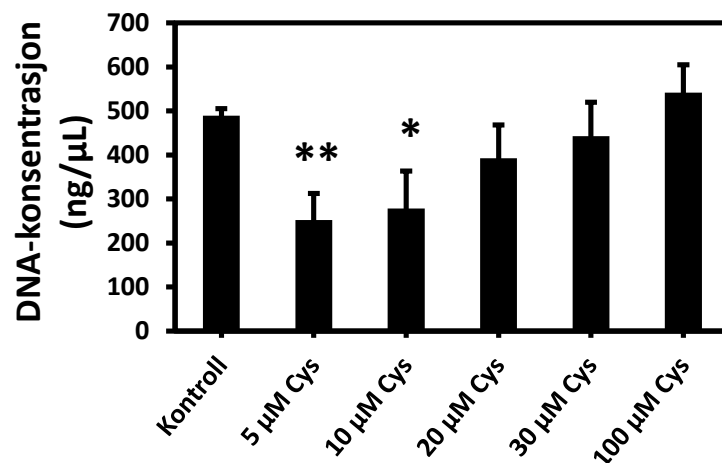
Det ble observert også en gradvis økning av proteinkonsentrasjon med økende cysteinkonsentrasjoner (Figur 37), noe som tydet på at økningen i triglyseridkonsentrasjon kunne skyldes økning i antall celler og ikke økning i mengde lipiddråper. Når mengde triglyserid ble normalisert mot protein, viste det seg at det ikke var noen forskjell i triglyseridkonsentrasjon mellom lave eller høye cysteinkonsentrasjoner (Figur 38).



**Figur 38: Mengde triglyserid per mengde protein.** Mengde triglyserid per mengde protein i kontrollceller behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400 µM, og testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400 µM OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før høsting på dag 5. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM for 3 uavhengige forsøk. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test.

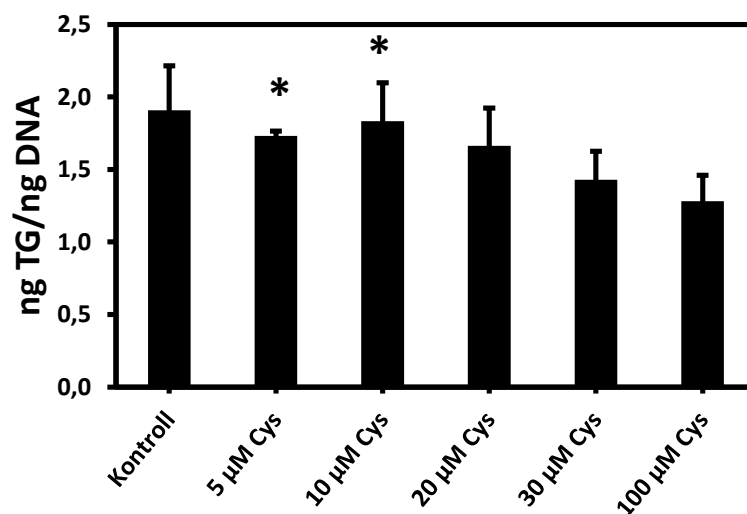
### 5.1.5 Kvantifisering av DNA

Cystein er en aminosyre som er byggestein for proteiner. For å finne ut om lav cystein påvirket mengde protein, uten å påvirke antall celler, ble det undersøkt om lav cystein påvirket antall celler ved å måle DNA konsentrasjonen som et mål på celleantall. DNA-konsentrasjon ble målt på de samme prøvene, som ble brukt til triglyserid- og proteinkvantifisering, ved hjelp av qRT-PCR som beskrevet under metoder (Figur 39).



**Figur 39: Konsentrasjon av DNA.** Konsentrasjon av DNA i kontrollceller behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400 µM, og testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400 µM OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før høsting på dag 5. Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM for 3 uavhengige forsøk. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  og \*\* $p < 0,01$  for de tilsvarende merkede konsentrasjonene mot 100 µM cystein.

Resultatet viste at det var mer DNA, og dermed flere celler, i brønnen som var behandlet med høyest cysteinkonsentrasjon (100  $\mu\text{M}$ ) kontra de som var behandlet med lavere cysteinkonsentrasjoner (Figur 39). Når mengde triglyserid ble normalisert mot mengde DNA var det mer triglyserid i celler med lav cystein i forhold til celler med høy cystein (Figur 40). Dette tydet på at reduksjonen i triglyseridkonsentrasjon, som tidligere var blitt observert i celler dyrket med lav cysteinkonsentrasjon, ikke nødvendigvis påvirket cellenes evne til å lagre triglyserider, men at lav cystein påvirket celleprolifisering og/eller celleoverlevelse.



**Figur 40: Mengde triglyserid per mengde DNA.** Mengde triglyserid per mengde DNA i kontrollceller behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjon fra dag 3 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før høsting på dag 5. Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 uavhengige forsøk. Statistiske analyser er utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  for konsentrasjonene 5 og 10  $\mu\text{M}$  mot 100  $\mu\text{M}$  cystein.

På bakgrunn av funnene ble det ønskelig å undersøke om lav cystein ved initiering av differensiering påvirket myoblastenes differensiering til myotuber.

## **5.2 Effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster til myotuber**

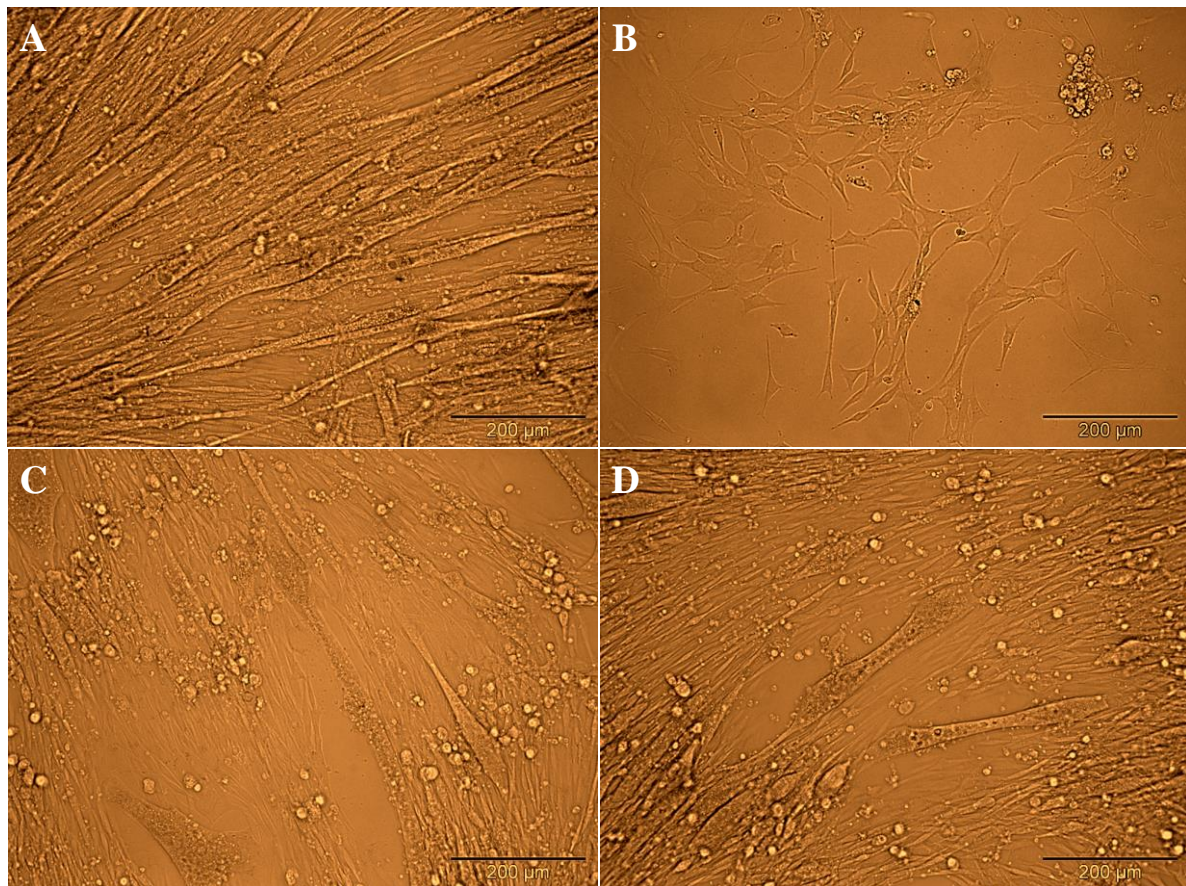
Dette forsøket ble utført for å undersøke om lav cystein påvirket differensiering av myoblaster. Effekt av lav cystein ble testet på to ulike muskelcellelinjer. Effekten ble observert både morfologisk ved hjelp av mikroskopering, og ved å måle relativ mRNA-uttrykk av en rekke differensieringsmarkører i prøver ved hjelp av qRT-PCR.

I dette forsøket ble kontrollcellene behandlet med «vanlig differensieringsmedium» [differensieringsmediet med normal cysteinkonsentrasjon (400  $\mu$ M, vedlegg 9.1.5)] under hele differensieringen, mens testcellene ble behandlet med «cysteintitreringsmedier» [differensieringsmedier uten L-Metionin og L-Cystin i utgangspunktet, som ble tilsatt L-Metionin (vedlegg 9.1.6) til sluttkonsentrasjon på 30  $\mu$ M og økende mengder L-Cystin (vedlegg 9.1.7) til sluttkonsentrasjon på 5-100  $\mu$ M (vedlegg 9.1.9)] under hele differensieringen (fra dag 0 av differensiering).

### **5.2.1 Effekt i Sol8 celler ved morfologisk observasjon**

Dette forsøket ble utført for å observere morfologisk effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster fra Sol8-cellelinje ved hjelp av mikroskopering. Celler fra Sol8 cellelinje ble sådd ut i 12-brønnersbrett med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering (på dag 0 av differensiering) ble det byttet til cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) med redusert konsentrasjon av metionin (30  $\mu$ M) og økende konsentrasjoner av cystein (10-100  $\mu$ M) i brønnene med testceller. Medier ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene. Kontrollcellene fikk vanlig differensieringsmedium under hele differensieringen. Medier ble fornyet på dag 3. Cellene ble stimulert til å lage lipiddråper med 400  $\mu$ M OA på dag 4, og på dag 5 ble de fiksert som beskrevet under metoder og fotografert i Olympus CKX41 lysmikroskop (Figur 41).





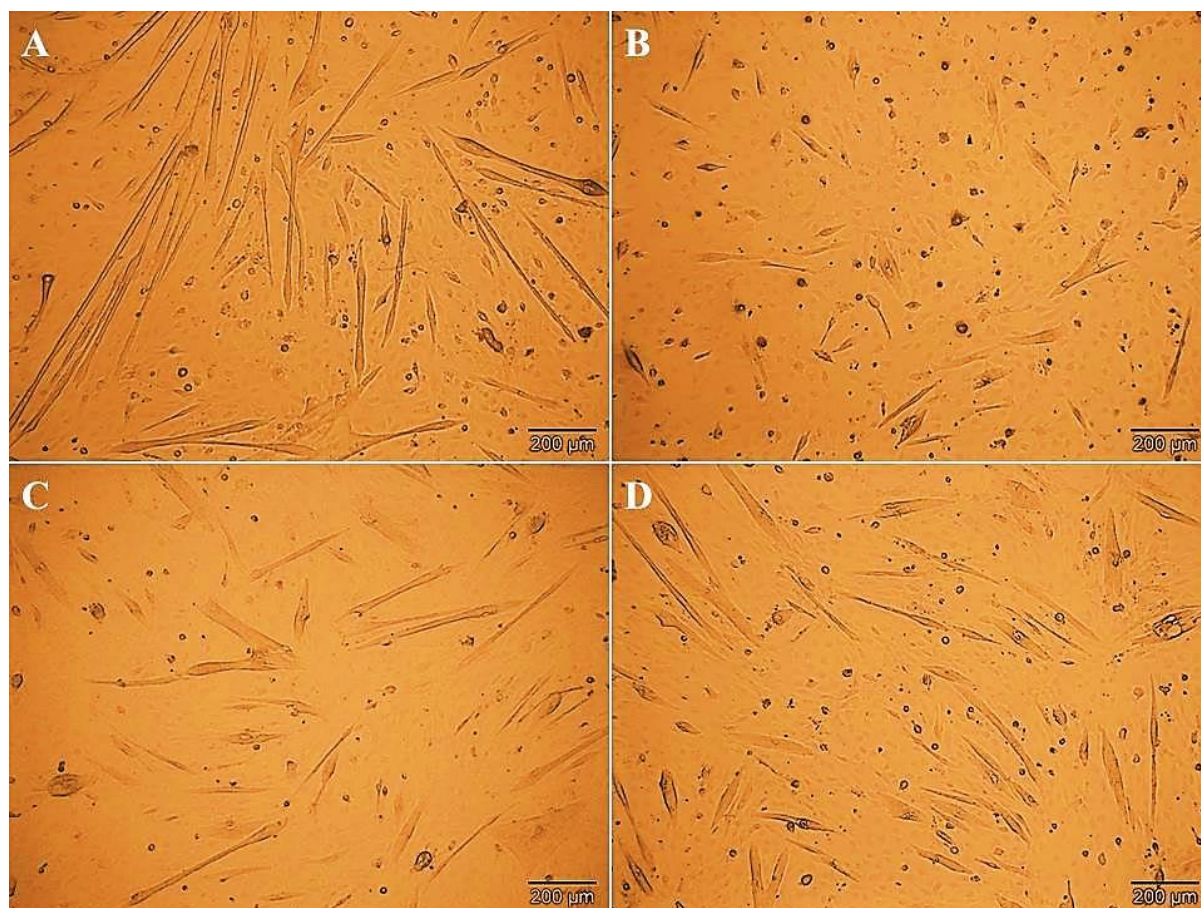
**Figur 41: Effekt av cystein på differensiering i Sol8 celler.** Ferdig differensierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller inkubert i 10  $\mu\text{M}$  cystein (B), 30  $\mu\text{M}$  cystein (C) og 100  $\mu\text{M}$  cystein (D) fra dag 0 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer (fra dag 4 til dag 5) før fiksering på dag 5. Bildene er tatt med 20x objektiv.

Ved mikroskopering i lysmikroskop ble det observert at i brønnene med testceller hadde myoblastene ikke differensiert seg like bra som i brønnene med kontrollceller. Cellene var bedre differensiert med økende cysteinkonsentrasjoner og de med lavest cystein hadde ikke differensiert i det hele tatt (Figur 41).

### 5.2.2 Effekt i C2C12 celler ved morfologisk observasjon

Dette forsøket ble utført for å observere morfologisk effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster fra C2C12-cellelinje ved hjelp av mikroskopering. Celler fra C2C12-cellelinje ble sådd ut i 12-brønnersbrett med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering (på dag 0 av differensiering) ble det byttet til cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) med redusert konsentrasjon av metionin (30  $\mu\text{M}$ ) og økende konsentrasjoner av cystein (10-100  $\mu\text{M}$ ) i brønnene med testceller. Medier ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene. Kontrollcellene fikk vanlig

differensieringsmedium under hele differensieringen. Medier ble fornyet på dag 3. Medier ble fornyet igjen og cellene ble stimulert til å lage lipidråper med 400  $\mu\text{M}$  OA på dag 6, og på dag 7 ble de fiksert som beskrevet under metoder og fotografert i Olympus CKX41 lysmikroskop (Figur 42).



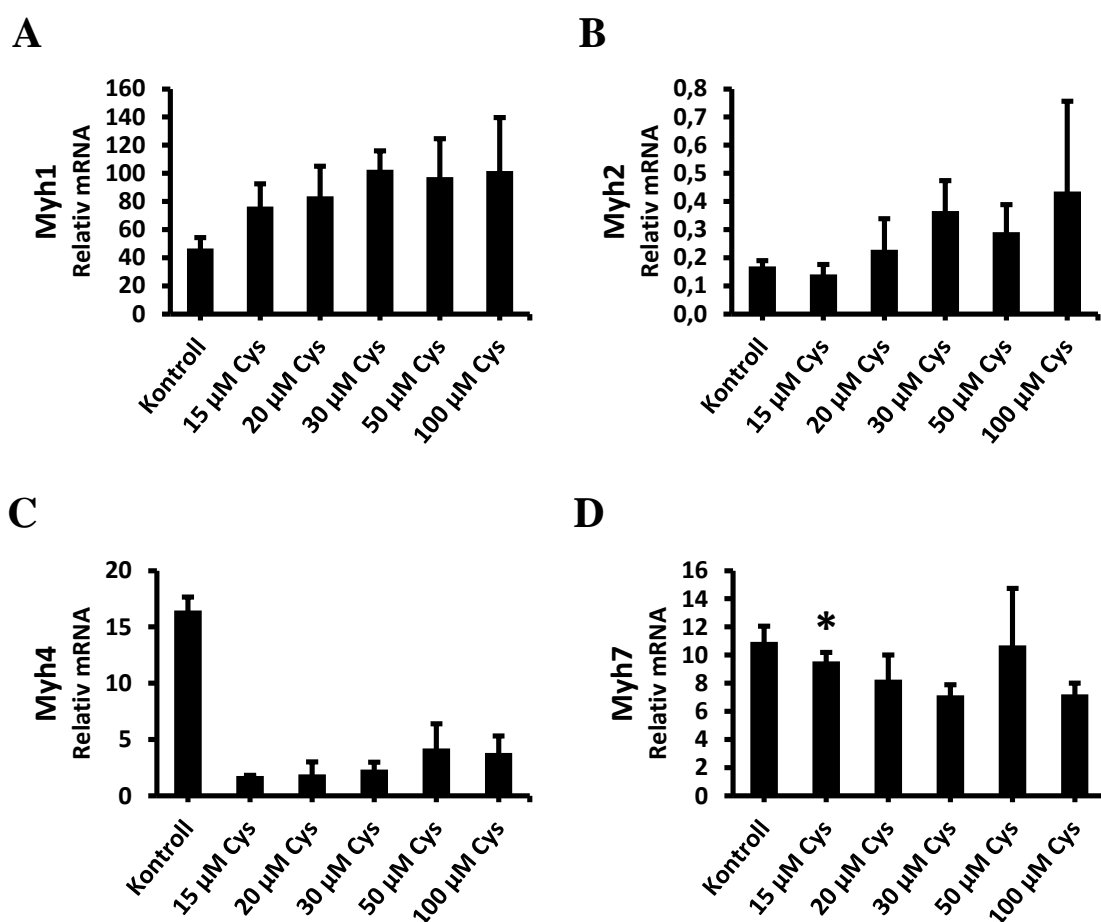
**Figur 42: Effekt av cystein på differensiering i C2C12 celler.** Ferdig differensierte kontrollceller (A) behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$ , og testceller inkubert i 10  $\mu\text{M}$  cystein (B), 30  $\mu\text{M}$  cystein (C) og 100  $\mu\text{M}$  cystein (D) fra dag 0 av differensiering. Cellene er forbehandlet med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer (fra dag 6 til dag 7) før fiksering på dag 7. Bildene er tatt med 10x objektiv.

Ved mikroskopering i lysmikroskop ble det observert samme resultat som hos Sol8 celler. I brønnene med testceller hadde myoblastene ikke differensiert seg like bra som i brønnene med kontrollceller. Cellene var bedre differensiert med økende cysteinkonsentrasjon og de med lavest cystein hadde nesten ikke differensiert i det hele tatt (Figur 42). For å undersøke nærmere effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster ble uttrykk av en rekke differensieringsmarkører og muskelfibergener studert ved qRT-PCR.



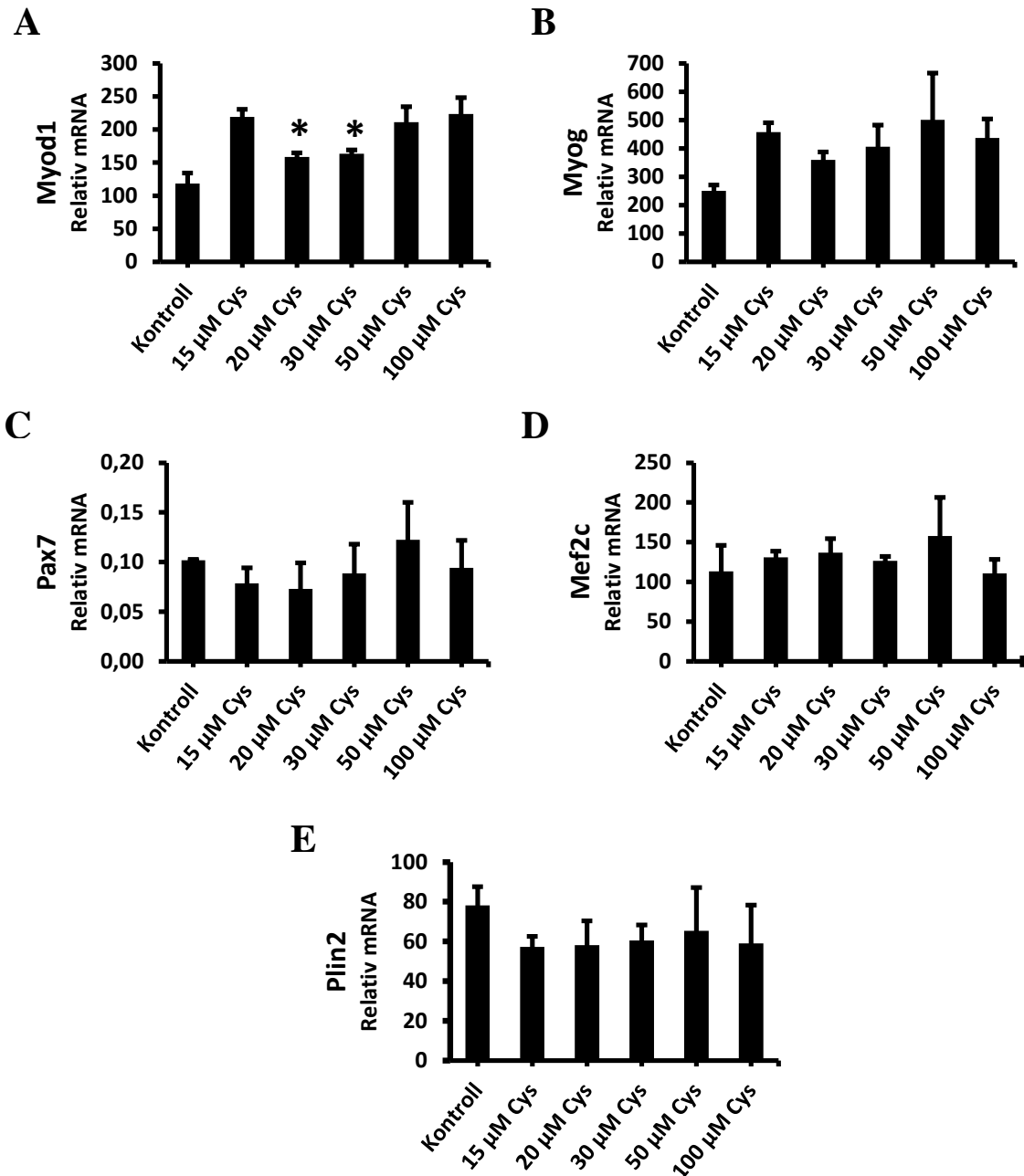
### 5.2.3 Identifisering av differensieringsmarkører i Sol8 celler ved qRT-PCR

Dette forsøket ble utført for å undersøke om lav cystein påvirket relativ mRNA-uttrykk av muskelfibergener og differensieringsmarkører i Sol8-celler ved hjelp av qRT-PCR. Celler fra Sol8 ble sådd ut og behandlet som beskrevet under 5.2.1. På dag 5 ble de høstet til qRT-PCR for å analysere differensieringsmarkører. Total RNA ble isolert og RNA konsentrasjon i alle prøver ble målt som beskrevet under metoder. Etter syntese av cDNA ble prøvene undersøkt for uttrykk av muskelfibergener (Myh1, Myh2, Myh3, Myh4, Myh7), Myod1, Myog, og Mef2c som er viktige for differensiering av myoblaster til myotuber (differensieringsmarkører), og Pax7 som er uttrykt i myoblaster. I tillegg ble genet Plin2 undersøkt. Alle disse ble relatert til uttrykket av TBP som endogen kontroll. For å undersøke effekt av lav cystein på uttrykk av genene ble relativ mRNA-verdier av de lavere konsentrasjonene (15-50  $\mu\text{M}$ ) sammenlignet med den høyeste konsentrasjonen (100  $\mu\text{M}$ ) i prøver av testceller ved hjelp av tosidig uparet t-test (Figur 43).



**Figur 43: Uttrykk av Myh1, Myh2, Myh4 og Myh7 i Sol8 celler ved ulike konsentrasjoner av cystein.** Figuren viser uttrykk av Myh1 (A), Myh2 (B), Myh4 (C) og Myh7 (D) relatert til TBP i Sol8 celler behandlet med vanlig differensieringsmedium (kontroll), og testceller behandlet med ulike cysteinkonsentrasjoner fra dag 0 av differensiering. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per prøve. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  for konsentrasjonen 15  $\mu\text{M}$  mot 100  $\mu\text{M}$  cystein.

Det ble ikke observert en signifikant forskjell i mRNA uttrykk hos de andre Myh-genene (Myh1, Myh2 og Myh4) ved lavere cysteinkonsentrasjoner mot konsentrasjonen på 100  $\mu$ M (Figur 43). Hos Myh3 var det nesten ingen forskjell i det hele tatt i verdier av mRNA uttrykk av prøver med ulike cysteinkonsentrasjoner.



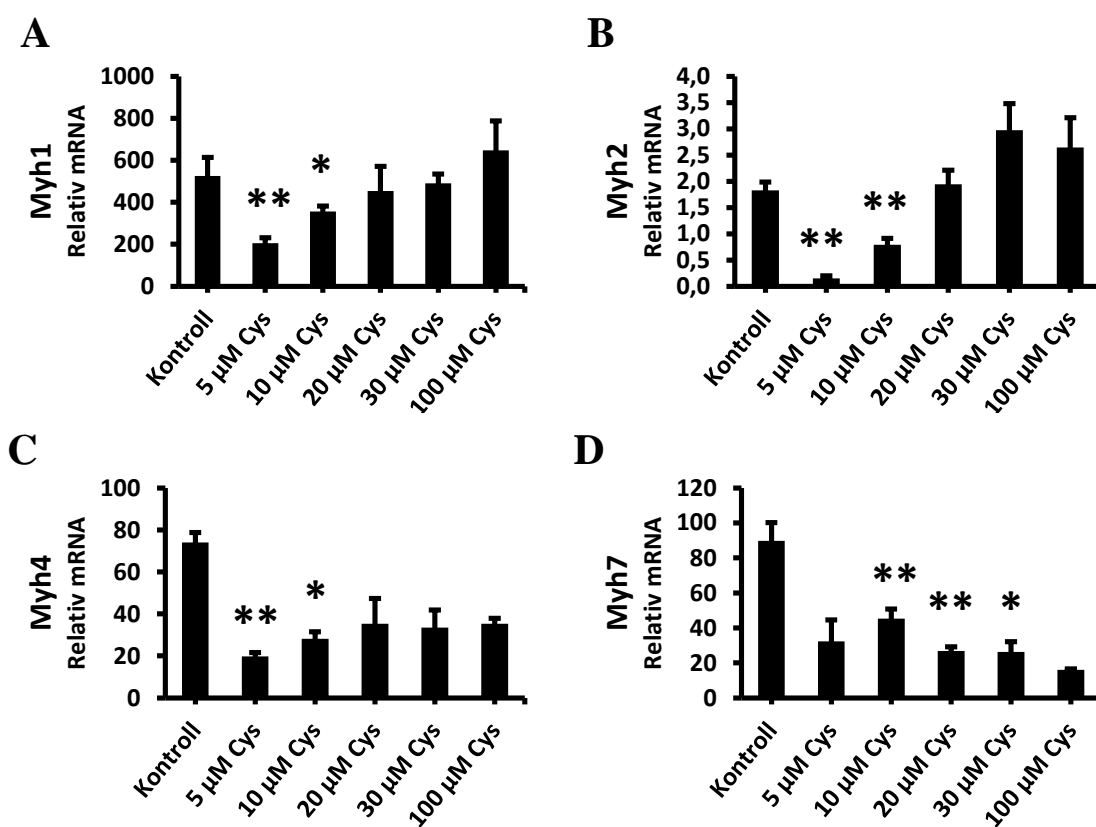
**Figur 44: Uttrykk av Myod1, Myog, Pax7, Mef2c og Plin2 i Sol8 celler ved ulike konsentrasjoner av cystein.** Figuren viser uttrykk av Myod1 (A), Myog (B), Pax7 (C), Mef2c (D) og Plin2 (E) relatert til TBP i Sol8 celler behandlet med vanlig differensieringsmedium (kontroll), og testceller behandlet med ulike cysteinkonsentrasjoner fra dag 0 av differensiering. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per prøve. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  for konsentrasjoner 20 og 30  $\mu$ M mot 100  $\mu$ M cystein.

Det ble ikke observert en signifikant forskjell i mRNA uttrykk hos de andre genene enn Myod1 ved lavere cysteinkonsentrasjoner mot konsentrasjonen på 100  $\mu$ M (Figur 44).

## 5.2.4 Identifisering av differensieringsmarkører i C2C12 celler ved qRT-PCR

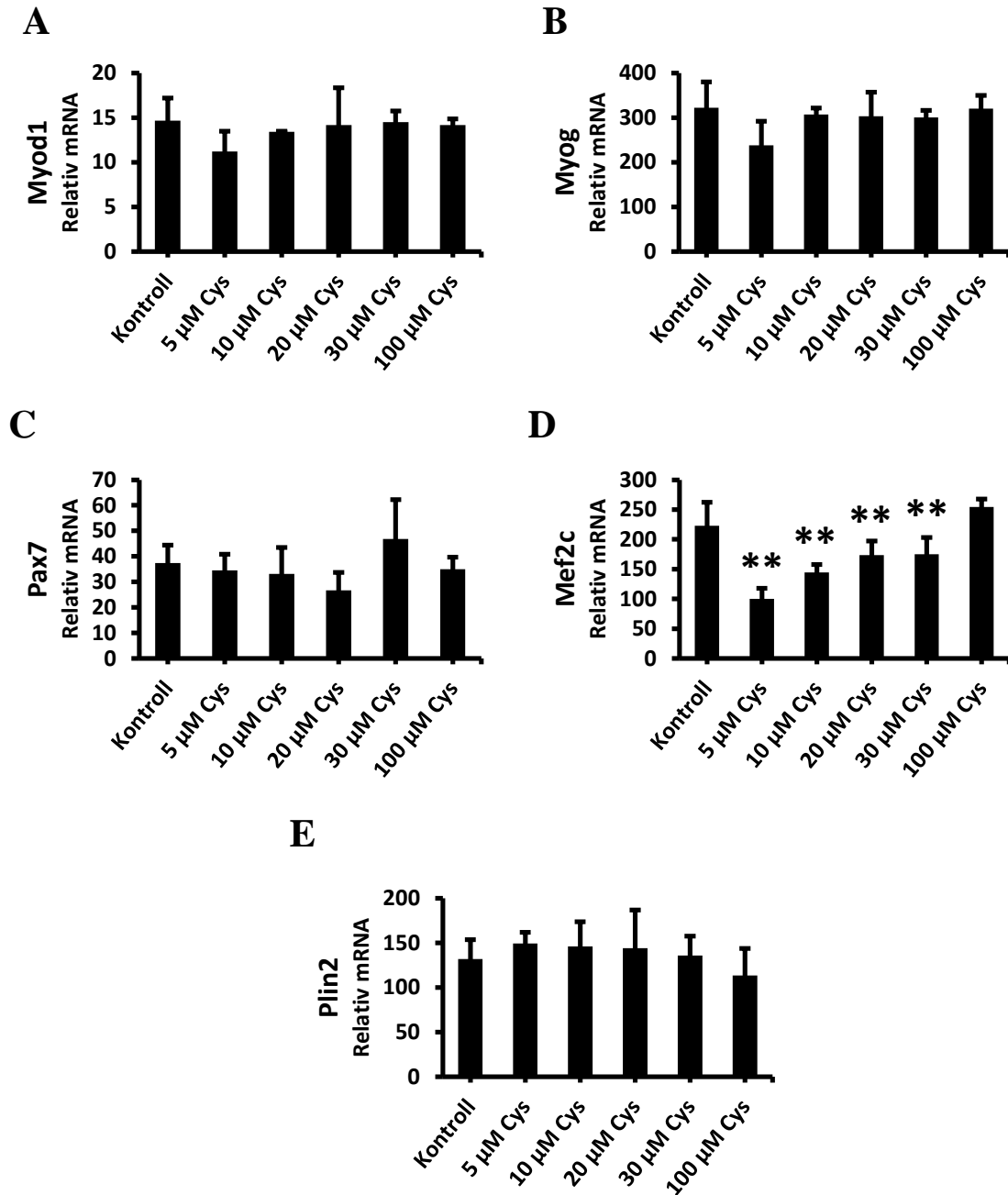
Dette forsøket ble utført for å undersøke om lav cystein påvirket relativ mRNA-uttrykk av muskelfibergener og differensieringsmarkører i C2C12-celler ved hjelp av qRT-PCR. Celler fra C2C12 cellelinje ble sådd ut og behandlet som beskrevet under 5.2.2. På dag 7 ble de høstet til qRT-PCR for å analysere differensieringsmarkører. Total RNA ble isolert og RNA konsentrasjon i alle prøver ble målt som beskrevet under metoder. Etter syntese av cDNA ble prøvene undersøkt for uttrykk av muskelfibergener (Myh1, Myh2, Myh3, Myh4, Myh7), Myod1, Myog, og Mef2c som er viktige for differensiering av myoblaster til myotuber (differensieringsmarkører), og Pax7 som er uttrykt i myoblaster. I tillegg ble genene Plin2 undersøkt. Alle disse ble relatert til uttrykket av TBP som endogen kontroll.

For å undersøke effekt av lav cystein på uttrykk av differensieringsmarkørene ble relativ mRNA-verdier av de lavere konsentrasjonene (5-30  $\mu$ M) sammenlignet med den høyeste konsentrasjonen (100  $\mu$ M) i prøver av testceller ved hjelp av tosidig uparet t-test (Figur 45).



**Figur 45: Uttrykk av Myh1, Myh2, Myh4 og Myh7 i C2C12 celler ved ulike konsentrasjoner av cystein.** Figuren viser uttrykk av Myh1 (A), Myh2 (B), Myh4 (C) og Myh7 (D) relatert til TBP i C2C12 celler behandlet med vanlig differensieringsmedium (kontroll), og testceller behandlet med ulike cysteinkonsentrasjoner fra dag 0 av differensiering. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per prøve. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,05 og \*\*p<0,01 for de tilsvarende merkede konsentrasjonene mot 100  $\mu$ M cystein.

Hos Myh3 var det nesten ingen forskjell i det hele tatt i verdier av mRNA uttrykk av prøver med ulike cysteinkonsentrasjoner.



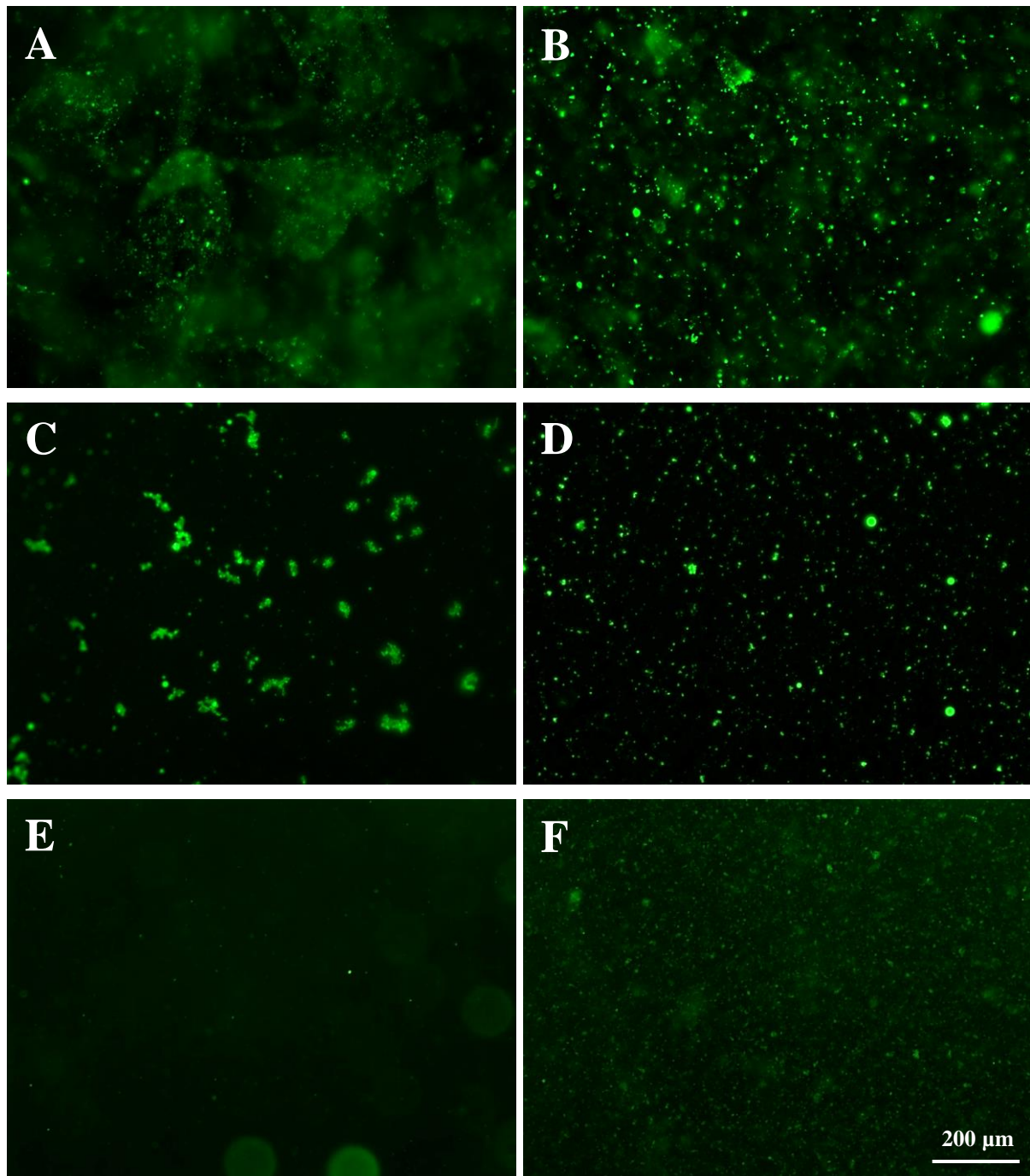
**Figur 46: Uttrykk av Myod1, Myog, Pax7, Mef2c og Plin2 i C2C12 celler ved ulike konsentrasjoner av cystein.** Figuren viser uttrykk av Myod1(A), Myog (B), Pax7 (C), Mef2c (D) og Plin2 (E) relatert til TBP i C2C12 celler behandlet med vanlig differensieringsmedium (kontroll), og testceller behandlet med ulike cysteinkonsentrasjoner fra dag 0 av differensiering. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per prøve. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*\* $p < 0,01$  for konsentrasjonene 5, 10, 20 og 30  $\mu$ M mot 100  $\mu$ M cystein.

Det ble ikke observert en signifikant forskjell i mRNA uttrykk av genene Myod1, Myog, Pax7 og Plin2 ved lavere cysteinkonsentrasjoner mot konsentrasjonen på 100  $\mu$ M (Figur 46).

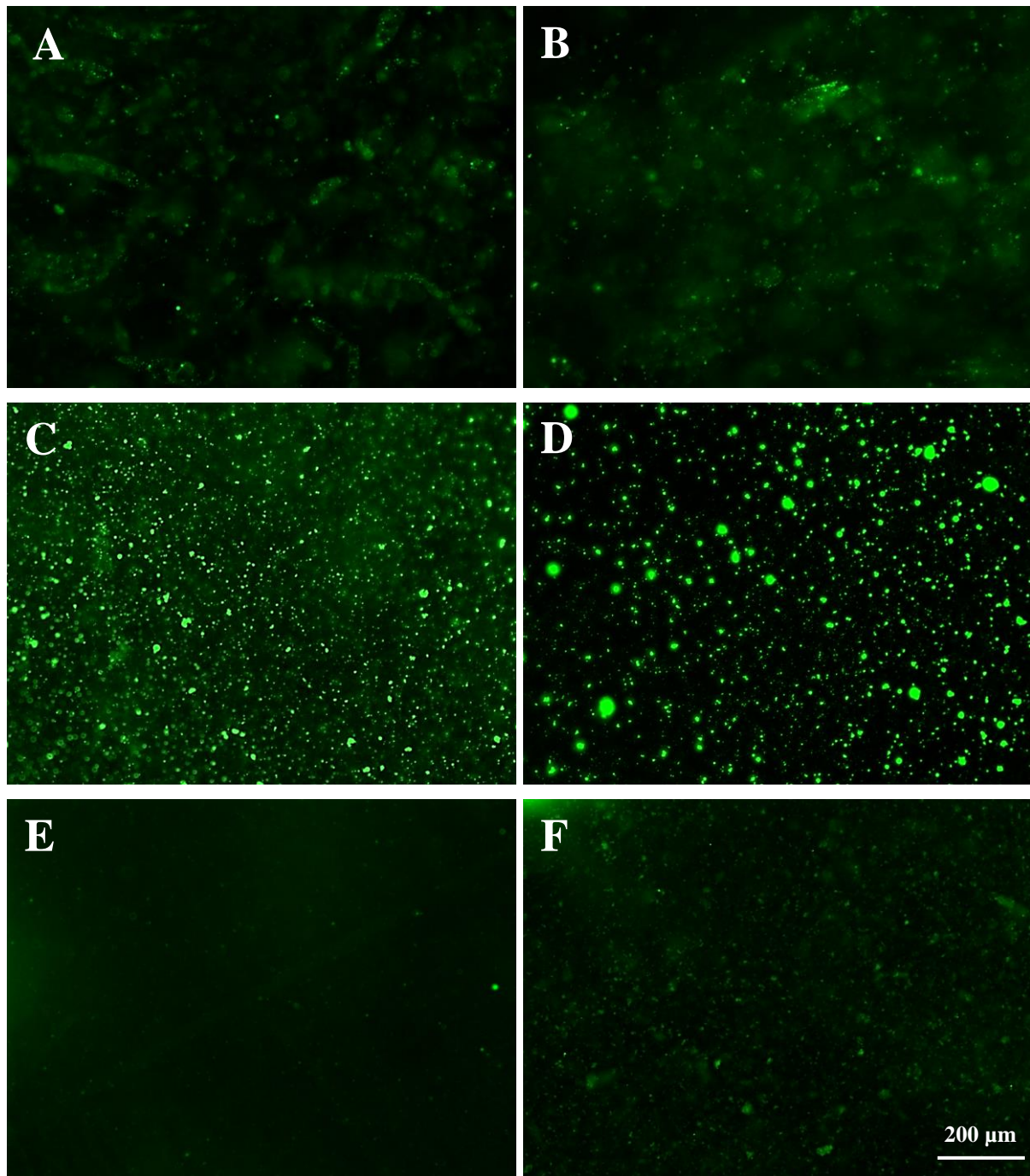
## 5.3 Isolering av lipiddråper

For å undersøke om lipiddråper i celler dyrket med lav cystein er forskjellige fra lipiddråper i celler dyrket med høy cystein, ble det testet ut om det var mulig å isolere lipiddråper fra Sol8 cellene. Dette forsøket ble også utført for å undersøke effekt av nitrogenkavitasjon på celleoppbrytning og effekt av tetthetsgradient ultrasentrifugering på renhet av lipiddråper. Celler fra Sol8 cellelinje ble sådd ut i 10 petriskåler med vekstmedium (vedlegg 9.1.3) for å proliferere. Etter 2 dagers proliferering ble det byttet til vanlig differensieringsmedium (vedlegg 9.1.5) i alle skåler (på dag 0 av differensiering). På dag 3 ble mediet erstattet med cysteintitreringsmedier (vedlegg 9.1.9) med cysteinkonsentrasjon på 10  $\mu\text{M}$  i 5 skåler og 100  $\mu\text{M}$  i de 5 resterende skålene. Mediet ble skiftet igjen etter 4 timer for å fjerne eventuelt cystein som var frigjort til mediet fra cellene. Cellene ble stimulert til å lage lipiddråper med 400  $\mu\text{M}$  OA på dag 4, og på dag 5 ble de høstet som beskrevet under metoder for å isolere lipiddråper.

Under lipiddråpeisoleringsprosessen ble det tatt flere prøver før og etter hver metode («A» - «F») som beskrevet under metoder (4.7.2) og illustrert på Figur 30. Disse prøvene ble tatt for å undersøke effekt av nitrogenkavitasjon på lysing av celler og effekt av tetthetsgradient ultrasentrifugering på renhet av lipiddråper slik at effektiviteten til isoleringsteknikken kunne observeres. 25  $\mu\text{L}$  av hver av disse prøvene på 50  $\mu\text{L}$  ble tatt ut i nye Eppendorfrør og tilsatt 10  $\mu\text{L}$  Bodipy (493/503) som var fortynnet 1:1000 med PBS (1  $\mu\text{M}$  sluttkonsentrasjon). Etter blanding ble de fargede prøvene (35  $\mu\text{L}$  hver) overført til petriskål med glassbunn og dekket med dekkglass. Prøvene ble mikroskopert og fotografert i Zeiss Heating Units XLS fluorescensmikroskop (Figur 47 og Figur 48).



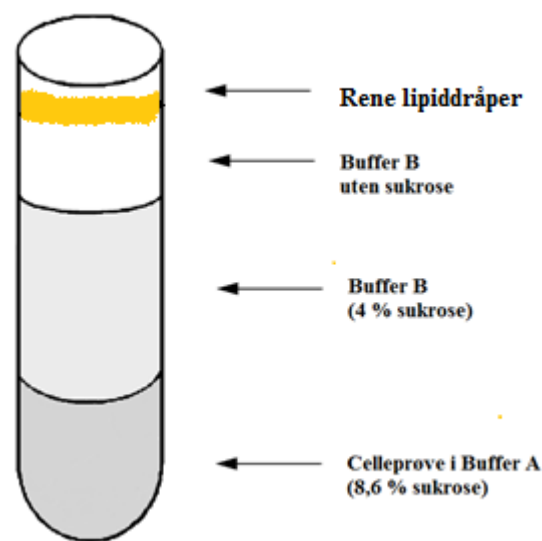
**Figur 47: Lipiddråper fra Sol8 celler behandlet med 10  $\mu$ M cystein.** Lipiddråper i prøver tatt under lipiddråpeisolering fra Sol8 celler behandlet med 10  $\mu$ M cystein fra dag 3 av differensiering og forbehandlet med 400  $\mu$ M OA i 24 timer før høsting. Bilder er tatt fra prøven før nitrogenkavitasjon (**A**), fra prøven etter nitrogenkavitasjon (**B**), fra prøven før ultrasentrifugering (**C**), fra prøven etter ultrasentrifugering (**D**), fra skillelaget mellom fasene i Beckmanrøret etter ultrasentrifugering (**E**) og fra pelleten i Beckmanrøret etter ultrasentrifugering (**F**). Bildene er tatt med 10x objektiv.



**Figur 48: Lipiddråper fra Sol8 celler behandlet med 100  $\mu$ M cystein.** Lipiddråper i prøver tatt under lipiddråpeisolering fra Sol8 celler behandlet med 100  $\mu$ M cystein fra dag 3 av differensiering og forbehandlet med 400  $\mu$ M OA i 24 timer. Bilder er tatt fra prøven før nitrogenkavitasjon (**A**), fra prøven etter nitrogenkavitasjon (**B**), fra prøven før ultrasentrifugering (**C**), fra prøven etter ultrasentrifugering (**D**), fra skillelaget mellom fasene i Beckmanrøret etter ultrasentrifugering (**E**) og fra pelleten i Beckmanrøret etter ultrasentrifugering (**F**). Bildene er tatt med 10x objektiv.



Ut fra Figur 47 **A** og **B** ser det ut som nitrogenkavitasjon er en effektiv måte å bryte opp cellene på mens selve lipiddråpene holdes intakt, slik at vi får lipiddråpene ut fra cellene som frie dråper (**B**). Dråpene kan da isoleres lettere og dette øker utbyttet. Denne effekten er mindre synlig i Figur 48 som antagelig skyldes en tilfeldighet. Det ser også ut som det er stor forskjell i renhet av lipiddråper etter vanlig lavhastighetssentrifugering sammenlignet med etter tetthetsgradient ultrasentrifugering, noe som er bedre synlig i Figur 48 **C** og **D**. Lipiddråpene blir mye renere etter å ha flyttet på toppen av Beckmanrøret gjennom de tre tetthetsgradientfasene av sukrose enn uten denne tetthetsgradienten (Figur 49).



**Figur 49: Beckmanrør med tetthetsgradient av sukrose.** Lipiddråpene i celleprøven som er løst i 5x Buffer A flyter opp gjennom de tre lagene med senkende sukrosekonsentrasjon under tetthetsgradient ultrasentrifugeringen. Dette gjør at de kommer opp som mye renere lipiddråper enn uten denne tetthetsgradienten.

Det ser ut som om det blir igjen veldig få lipiddråper i skillelaget mellom gradientsfasene og i pelleten av celleforurensninger i Beckmanrøret etter ultrasentrifugeringen (Figur 47 og Figur 48 **E** og **F**), noe som tyder på at teknikken er ganske effektiv.

Utfra Figur 47 og Figur 48 ser det ut som om det er flere lipiddråper i prøven behandlet med 100  $\mu\text{M}$  cystein i forhold til 10  $\mu\text{M}$ . Flere av lipiddråpene i prøven med høy cystein ser også ut å være større enn de med lav cystein, noe som kan tyde på at cystein muligens påvirker lagring av lipiddråper i myotuber.



## 6 Diskusjon

Cystein er en semiessensiell aminosyre for den kan syntetiseres fra den essensielle aminosyren metionin [53]. For å undersøke effekt av lav cystein på enten differensiering av myoblaster eller lagring av lipiddråper i myotuber ble derfor også konsentrasjonen til metionin i cysteintitreringsmedier redusert fra 200  $\mu\text{M}$  til 30  $\mu\text{M}$  (0,03 g/L) i denne oppgaven [73, 74].

Totalcystein i plasma (tCys), som består av både fritt, albuminbundet og disulfidform (cystin) av cystein, er stort sett oksidert, det vil si som cystin. Cellulær tCys derimot er stort sett i redusert form, det vil si som cystein [9]. Ved cysteininsuffisiens (cysteinmangel) i mennesker er konsentrasjonen av cystein i plasma typisk rundt 10  $\mu\text{M}$  [57]. Konsentrasjonen av fritt cystein varierer normalt mellom ca. 40 og 120  $\mu\text{M}$  [9]. For å undersøke effekt av lav kontra normal cysteinkonsentrasjon ble det i denne oppgaven brukt cysteintitreringsmedier, som i utgangspunktet ikke hadde metionin og cystein, men ble tilsatt metionin til sluttkonsentrasjon på 30  $\mu\text{M}$  og cysteinkonsentrasjoner på mellom 5 og 100  $\mu\text{M}$ . Disse konsentrasjonene samsvarer med lav til normal cysteinkonsentrasjon i blodet. Konsentrasjonen på 5  $\mu\text{M}$  benyttet for C2C12 cellene gav resultater som tydet på at denne konsentrasjonen var lavere enn det burde være.

### 6.1 Oppsummering av oppgavens hovedfunn

Hovedfunnet i denne masteroppgaven var manglende differensiering av både Sol8 og C2C12 celler som ble inkubert i medium med lav cysteinkonsentrasjon fra dag 0 av differensiering. Morfologisk observasjon ved mikroskopering viste økende differensiering med økende konsentrasjon av cystein, hvor optimal differensiering ble observert hos kontrollceller som var inkubert i vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$  (Figur 41 og Figur 42) [73].

Ved bestemmelse av genuttrykket av muskelfibergener i Sol8 celler ved qRT-PCR ble det ikke observert en signifikant forskjell i mRNA uttrykk av Myh1, Myh2 og Myh4 mellom lavere cysteinkonsentrasjoner (15-50  $\mu\text{M}$ ) og den høyeste konsentrasjonen (100  $\mu\text{M}$ ) (Figur 43). En signifikant høyere Myh7-uttrykk ble observert hos celler inkubert i 15  $\mu\text{M}$  cystein sammenlignet med 100  $\mu\text{M}$  cystein (Figur 43 D). Dessuten var det en sterk nedgang i

uttrykk av Myh4 i celler behandlet med cysteintitreringsmedier (testceller) i forhold til celler behandlet med vanlig differensieringsmedium (kontrollceller) (Figur 43 C).

Ved bestemmelse av genuttrykket av differensieringsmarkører i Sol8 celler ble det ikke observert endring av Myod1, Myog, Pax7, Mef2c eller Plin2 med økende cysteinkonsentrasjoner, men det ble observert en signifikant lavere Myod1-uttrykk i celler inkubert med 20 og 30  $\mu\text{M}$  cystein sammenlignet med 100  $\mu\text{M}$  cystein.

Ved bestemmelse av genuttrykket av muskelfibergener i C2C12 celler ved qRT-PCR ble det observert en signifikant lavere mRNA-uttrykk av Myh1, Myh2 og Myh4 hos celler behandlet med de laveste cysteinkonsentrasjonene (5 og 10  $\mu\text{M}$ ) sammenlignet med den høyeste konsentrasjonen (100  $\mu\text{M}$ ) (Figur 45). Dessuten var også mRNA-uttrykk av Myh7 hos celler behandlet med 10, 20 og 30  $\mu\text{M}$  cystein signifikant høyere enn celler behandlet med 100  $\mu\text{M}$  cystein (Figur 45 D).

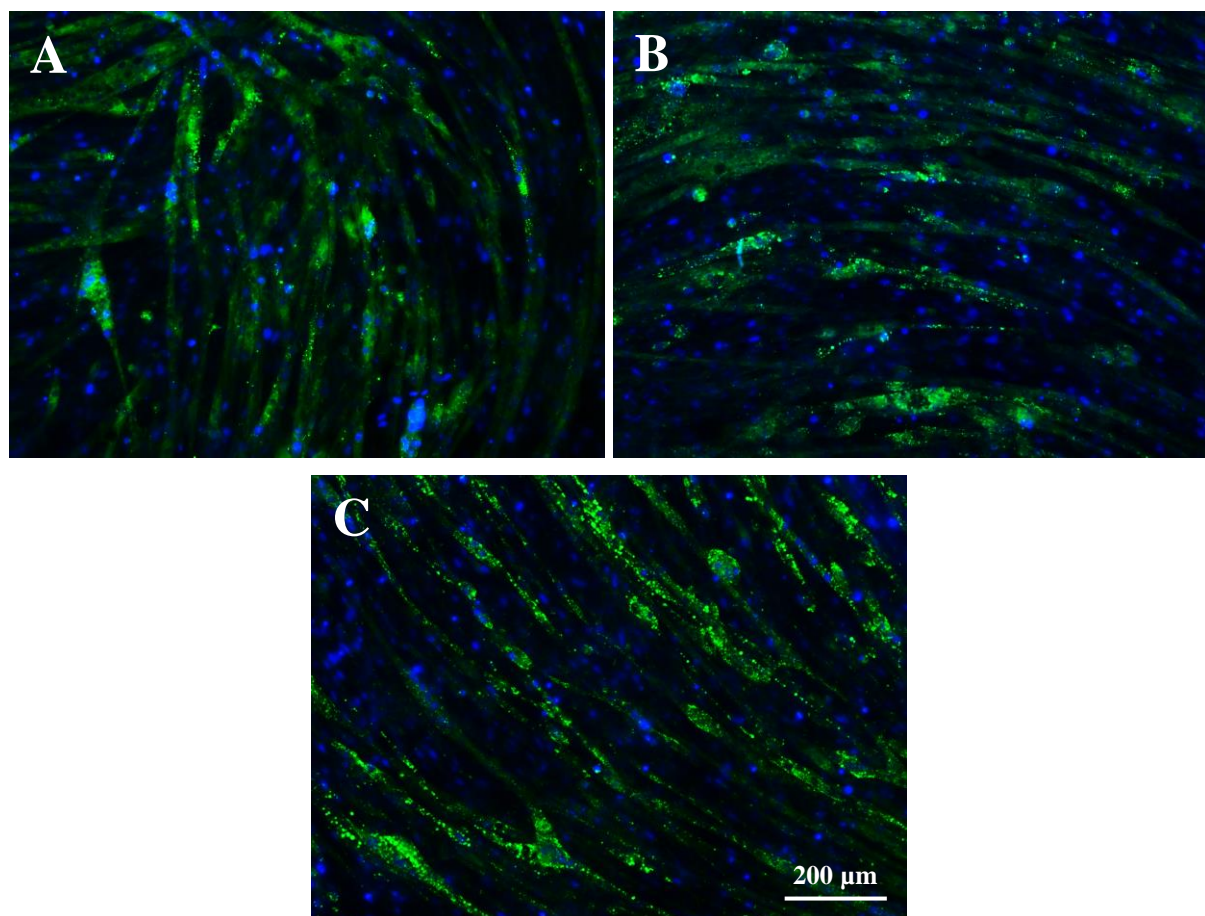
Ved bestemmelse av genuttrykket av differensieringsmarkører i C2C12 celler ble det ikke observert endring av Myod1, Myog, Pax7 eller Plin2 med økende cysteinkonsentrasjoner (Figur 46). Det ble derimot observert et signifikant lavere uttrykk av Mef2c i celler behandlet med 5, 10, 20 og 30  $\mu\text{M}$  cystein sammenlignet med 100  $\mu\text{M}$  cystein (Figur 46 D).

I forsøket hvor effekten av lav cystein på lagring av lipiddråper i C2C12 myotuber ble undersøkt ved mikroskopering, ble det funnet ut at denne celletypen ikke var godt egnet til å undersøke denne effekten, på grunn av akkumulering av tilsatt OA i LDer i myoblaster istedenfor i myotuber. Av denne grunn ble Sol8 celler isteden benyttet videre i forsøkene.

For å undersøke effekten av lav cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler ble cellene først sådd ut i petriskål med glassbunn for å kunne ta bilder med bedre oppløsning, men på glass løsnet cellene fra bunnen etter å ha differensiert i et par dager. Utsåing på glass var av den grunn ikke egnet til disse forsøkene og cellene ble sådd ut i 12-brønnersbrett med plastbunn før mikroskopering.

I forsøket hvor effekten av lav cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler sådd ut i 12-brønners brett ble undersøkt ved å farge lipiddråpene med Bodipy (493/503), ble det ved mikroskopering ikke observert en merkbar forskjell i total mengde lipiddråper akkumulert i celler behandlet med lavere cysteinkonsentrasjoner (10 og 30  $\mu\text{M}$ ) sammenlignet med den høyeste cysteinkonsentrasjonen (100  $\mu\text{M}$ ) fra dag 3 av differensiering. Forskjellen var ikke merkbar hverken i celler uten tilsatt OA, celler inkubert med 100  $\mu\text{M}$  OA eller celler inkubert

med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer før fiksering (Figur 32, Figur 33 og Figur 34). Mikroskoperingen gav imidlertid inntrykk av at det var flere og mindre lipiddråper i celler med lavest cysteinkonsentrasjon, mens litt færre og større lipiddråper i celler med høyest cysteinkonsentrasjon. Siden metoder for måling av størrelse eller kvantifisering av lipiddråpene ikke var tilgjengelig, kunne denne observasjonen ikke undersøkes nærmere. Det ble også observert flere og trolig større lipiddråper i celler inkubert med 400  $\mu\text{M}$  OA i forhold til celler inkubert med 100  $\mu\text{M}$  OA, og i celler inkubert med 100  $\mu\text{M}$  OA i forhold til celler uten tilsatt OA, noe som tydet på at høyere konsentrasjon av OA i differensieringsmediet førte til mer lipiddråpeakkumulering i myotubene (Figur 50).



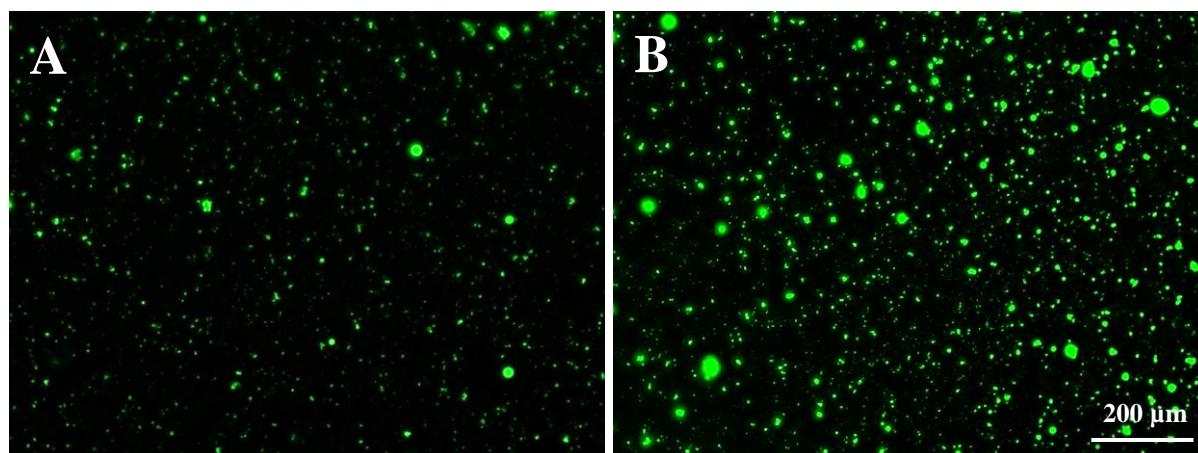
**Figur 50: Effekt av OA-konsentrasjon på akkumulering av lipiddråper.** Effekt av OA-konsentrasjon i differensieringsmedium på akkumulering av lipiddråper i kontrollceller (celler behandlet med vanlig differensieringsmedium under hele differensieringen), hvor **A** er ikke tilsatt OA, **B** er inkubert med 100  $\mu\text{M}$  OA, og **C** er inkubert med 400  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer før fiksering og farging med Bodipy (493/503) (grønn) og DAPI (blå).

I forsøket hvor effekten av lav cystein på lagring av lipiddråper i Sol8 celler sådd ut i 12-brønners brett ble undersøkt ved å farge lipiddråpene med Oil Red O, ble det ved

mikroskopering observert økende total mengde lipiddråper i celler inkubert med 10  $\mu\text{M}$  cystein til 100  $\mu\text{M}$  cystein fra dag 3 av differensiering (Figur 35). Det ble observert flest lipiddråper i celler behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu\text{M}$  (kontrollceller).

Ved kvantifisering av triglyserider i Sol8 celler dyrket med økende mengde cystein, ble det funnet at celleprøver høstet fra brønner dyrket med lav cystein inneholdt mindre triglyserid (Figur 36). Konsentrasjonen av protein og DNA var imidlertid også lavere for disse prøvene, slik at når mengde triglyserid ble justert i forhold til protein eller DNA mengde, var det ingen forskjell i triglyserid mellom prøver dyrket med lav eller høy cystein.

I lipiddråpeisoleringsforsøket ble nitrogenkavitasjon vist å være en effektiv teknikk for oppbrytning av celler uten å ødelegge lipiddåpene. Effekten er mest synlig i Figur 47 **A** og **B**, hvor **A** viser lipiddråpene før nitrogenkavitasjon og **B** viser lipiddråpene etter nitrogenkavitasjon. Ultrasentrifugering med tetthetsgradient av sukrose ble vist å være en effektiv måte for isolering av rene lipiddråper uten forurensning med andre celleorganeller. Denne effekten er bedre synlig i Figur 48 **C** og **D**, hvor **C** viser lipiddråpene før og **D** viser dem etter ultrasentrifugeringen. Effektiviteten til teknikken ble også vist både i Figur 47 **E** og **F** og i Figur 48 **E** og **F**, hvor det ble sett nesten ingen lipiddråper i hverken skillelaget mellom fasene (**E**) eller i pelleten av cellerester i bunnen (**F**) av Beckmanrøret etter ultrasentrifugeringen. Det ble dessuten observert mer lipiddråper og flere store lipiddråper i prøven behandlet med 100  $\mu\text{M}$  cystein sammenlignet med prøven behandlet med 10  $\mu\text{M}$  cystein fra dag 3 av differensiering (Figur 51).



**Figur 51: Effekt av lav cystein på isolerte lipiddråper.** Lipiddråper isolert fra celler behandlet med 10  $\mu\text{M}$  cystein (**A**) og 100  $\mu\text{M}$  cystein (**B**) fra dag 3 av differensiering, som er farget med Bodipy (493/503) etter tetthetsgradient ultrasentrifugering.

## 6.2 Effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber

De fleste dyrkede celler akkumulerer kun en liten mengde nøytrale lipider i lipiddråper. For å fremme syntese av triglyserider og dannelse av lipiddråper, kan dyrkingsmedium tilsettes fettsyrer kompleksbundet til albumin med fettsyrekonsentrasjon mellom 100  $\mu\text{M}$  og 1 mM. Oljesyre blir vanligvis benyttet til dette formålet fordi den er et godt substrat for triglyserid biosyntese [76]. I denne oppgaven ble på bakgrunn av dette laget en stockløsning med 6 mM OA + 2,4 mM BSA, som ble benyttet til å stimulere lipiddråpedannelse i cellene.

For å studere effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper ble lipiddråper i fikserte celler farget med Bodipy (493/503) som farger nøytrale lipider i levende eller fikserte celler og emitterer lysgrønt fluorescens [75]. Resultater fra forsøk på lagring av lipiddråper i C2C12-myotuber, som viste ved mikroskopering at tilsatt OA akkumulerte i myoblaster istedenfor i myotuber (Figur 31 A), kan forklares med at det er enten fettsyreopptaket som skjer mer effektivt i myoblaster enn i myotuber hos disse celler, eller at graden av lipolyse er høyere i myotubene enn i myoblastene. Dette gjorde C2C12 celler uegnet til å studere effekt av lav cystein på lagring av lipiddråper i myotuber. Denne problematikken ble derimot ikke observert i Sol8 celler, noe som tyder på forskjell mellom disse cellelinjene.

Ved studering av samme effekt i Sol8 celler farget med Bodipy (493/503) var det ikke lett å se en øyenfallende forskjell ved mikroskopering i total mengde lipiddråper akkumulert i myotuber inkubert i lav cystein sammenlignet med høy cystein, som vist på Figur 32, Figur 33 og Figur 34. En av årsakene til dette var muligens for mye bakgrunn som gjorde lipiddråpene mindre synlige. Bakgrunnen kunne skyldes at den grønne fargen kom fra veldig små lipiddråper som var spredt over hele cytoskjelettet, eller at cytoplasmaet i disse cellene ble også farget med Bodipy. En faktor til som gjorde observeringen vanskelig var at lipiddråper i Sol8-muskelceller (og trolig generelt i myocytter) er mye mindre i størrelse og flere i antall i forhold til lipiddråper i adipocytter, noe som gjør en slik observering vanskelig uten en tilgjengelig metode for måling av størrelse og kvantifisering av lipiddråpene.

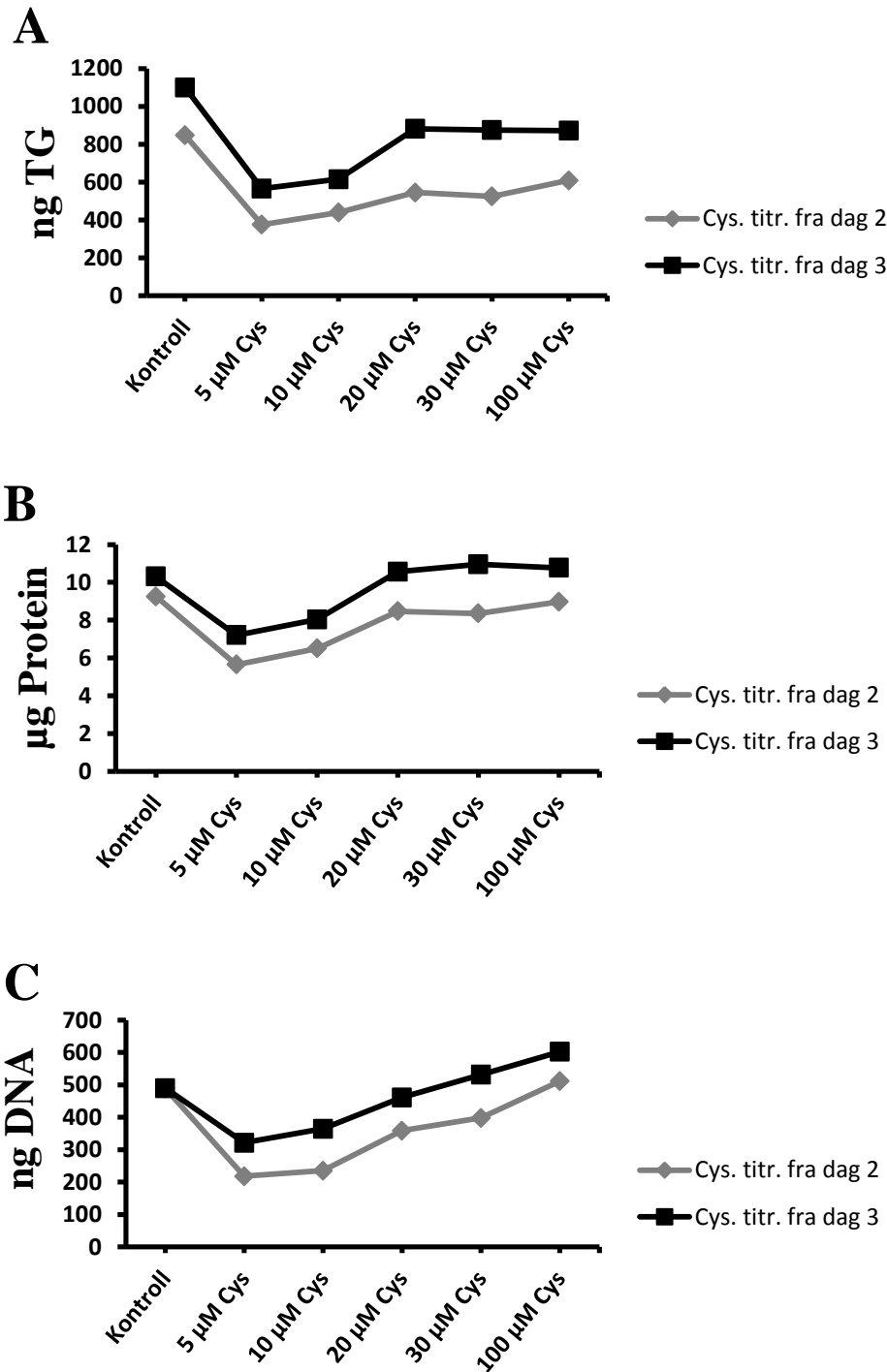
Studier har vist at celler med høy fosfatidylkolin (PC)-syntese danner forholdsvis mange og små lipiddråper, mens celler med høy fosfatidyletanolamin (PE)-syntese gir færre og større lipiddråper [76]. Inntrykket av det var forholdsvis større, men færre lipiddråper i celler behandlet med høyere cystein i forhold til lavere cystein ved mikroskopering i denne oppgaven, kan muligens ha en sammenheng med dette, som kan tyde på at cystein muligens har en effekt på sammensetning av fosfolipider i fosfolipidlaget på overflaten av

lipiddråpene, slik at høyere cystein fører til mersyntese av PE. Studier har også vist at overuttrykk av PLIN1a og PLIN5, som spesifikt binder til lipiddråper fylt med TG, øker størrelsen på lipiddråpene [77], noe som kan tyde på at disse perilipinene favoriserer syntese av PE fremfor PC. PLIN1 som først og fremst er uttrykt på lipiddråper i adipocytter, er lite uttrykt på overflaten av lipiddråper i skjelettmuskelceller [39], men PLIN5 uttrykkes hovedsakelig i vev med høy fettsyreoksidasjon, som blant annet sakte oksidative skjelettmuskelfibrer [78]. Det kunne derfor tenkes at cystein kunne muligens ha en indirekte effekt på størrelsen til lipiddråper via uttrykk av PLIN5, slik at høy cystein fører til høyere uttrykk av PLIN5, som igjen fører til mersyntese av PE. Studering av disse effektene forutsetter imidlertid nærmere undersøkelse av lipiddråpene, som eventuelt analysering av PE- og PC-sammensetning ved tynnsjikt-kromatografi og analysering av PLIN5-uttrykk ved PCR eller Western blotting.

Oil Red O er et ikke-fluorescerende fargestoff som farger nøytrale lipider, hovedsakelig triglyserider, oransjerødt [79]. Ved mikroskopering av fikserte celler som var farget med Oil Red O, ble det derimot observert en klar økende total mengde av lipiddråper med økende cysteinkonsentrasjon. For å studere denne effekten nærmere, ble triglyseridmengde i prøver kvantifisert. Siden triglyserider er et av de primære lipidene i lipiddråpekjernen [1], kan akkumulering av lipiddråper måles ved kvantifisering av triglyserider.

Triglyseridkonsentrasjon ble derfor målt som mål på mengde lipiddråper, mens protein- og DNA-konsentrasjon ble målt som mål på antall celler for å undersøke om økt cystein ga økt mengde lipiddråper uavhengig av en annen påvirkning av cellene. Det ble benyttet RIPA buffer til høsting av disse prøvene, som er et egnet lyseringsbuffer til dette formålet fordi det fremmer effektiv lysering av celler og solubilisering av proteiner samtidig som det forebygger degradering av proteiner [80]. Dataene fra disse forsøkene viste både økende triglyserid-, protein- og DNA-konsentrasjon med økende cysteinkonsentrasjon, noe som tydet på at lav cystein påvirket ikke selve lipiddråpelagringen direkte, men at den antakelig påvirket celleprolifisering/differensiering.

Det ble dessuten funnet ved et forsøk i denne oppgaven at i celler hvor det ble byttet til cysteintitreringsmedium (lav cystein) på dag 2 av differensiering var det mindre triglyserid, mindre protein og mindre DNA sammenlignet med celler som fikk byttet til cysteintitreringsmedium (lav cystein) på dag 3 av differensiering (Figur 52).



**Figur 52: Effekt av initiering av cysteintitrering på mengde TG, protein og DNA.** Initiering av cysteintitrering (lavere cystein) på dag 2 av differensiering gir mindre TG (A), mindre protein (B) og mindre DNA (C) i prøver enn på dag 3 av differensiering.

Dette forsøket, som viste at initiering av cysteintitrering på dag 2 av differensiering førte til mindre triglyserid-, protein- og DNA-konsentrasjon enn ved initiering av cysteintitrering på dag 3 av differensiering, tyder på at lavere cysteinkonsentrasjon, selv etter at myoblaster har differensiert i normal cysteinkonsentrasjon i 3 dager, fører til mindre celleoverlevelse og/eller

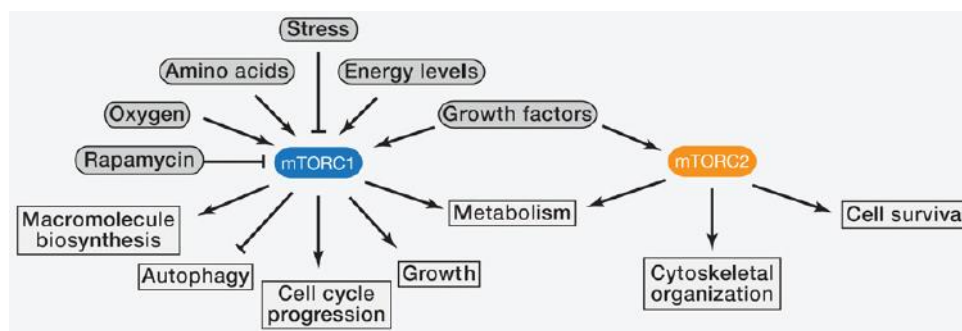
mindre differensiering. Ifølge protokollen skulle både Sol8- og C2C12-celler differensieres i 4-7 dager totalt. Når det blir skiftet til lav cystein på dag 3 av differensieringen, forstyrres differensieringsprosessen, slik at myoblaster ikke klarer å differensiere fullstendig til myotuber. For senere undersøkelse av effekt av cystein på selve lipiddråpene kan derfor cysteintitrering med fordel initieres senere enn på dag 3 av differensiering, for eksempel på dag 4 eller 5, slik at alle myoblaster har differensiert seg fullstendig til myotuber først. Det kan også forsøkes med cysteintitrering i kun et døgn under differensiering, for eksempel fra dag 3 til dag 4, eller fra dag 4 til dag 5, og så kan celler stimuleres med OA under siste døgn av differensiering med vanlig differensieringsmedium (med normal konsentrasjon av cystein) istedenfor cysteintitreringsmedier (lave konsentrasjoner av cystein).

### **6.3 Effekt av lav cystein på differensiering av myoblaster til myotuber**

Ved morfologisk observasjon ble det vist at lav cystein påvirket differensieringen av myoblaster til myotuber. Slik Figur 41 og Figur 42 viser, er det tydelig at celler inkubert i lav cystein (10  $\mu$ M) fra dag 0 av differensiering har nesten ikke differensiert i det hele tatt, mens med økende cysteinkonsentrasjon har flere og flere celler differensiert til myotuber. De best differensierte celler var kontrollceller som var behandlet med vanlig differensieringsmedium med cysteinkonsentrasjon på 400  $\mu$ M. Disse (kontrollceller) hadde differensiert så godt at myotuber hadde vokst i flere lag oppå hverandre. Disse funnene kan skyldes rollen til cystein som byggestein i proteiner under proteinmetabolisme [49, 50], effekt av cystein som aminosyre på uttrykk av aminosyrettransportører i skjelettmuskelceller [52], og på de intracellulære sensorene inni skjelettmuskelceller som responderer på aminosyretilgjengelighet og aktiverer mTORC1 [52, 81, 82].

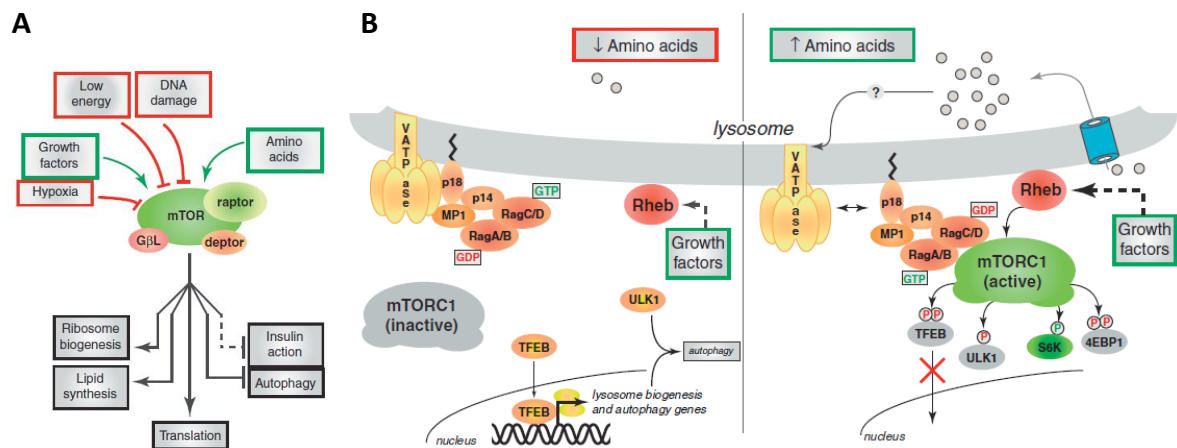
mTOR er target for et molekyl kalt rapamycin eller sirolimus, som er et makrolid (en gruppe antibiotika) med bredt antiproliferativ egenskap og brukes som et immunsuppressivt middel ved organ transplantasjoner (Rapamune<sup>®</sup>) [83, 84]. mTOR er en atypisk serin/treonin-proteinkinase som tilhører PI3K-kinasefamilien. Den interagerer med flere proteiner for å danne kompleksene mTORC1 og mTORC2. Disse to kompleksene har ulik sensitivitet mot rapamycin og ulike oppstrøms og nedstrøms [83] (Figur 53).





**Figur 53: mTORC1- og mTORC2-komplekser.** mTORC1 reagerer på aminosyrer, vekstfaktor, energi, oksygen og stress og er svært sensitiv mot rapamycin. Den fremmer cellevekst ved å indusere og hemme anabolske og katabolske prosesser tilsvarende og driver celledyklusprogresjon. mTORC2 reagerer på vekstfaktorer og regulerer celleoverlevelse og metabolisme samt cytoskjelettet. Den er ikke sensitiv mot akutt rapamycin men dens struktur kan forstyrres ved langvarig rapamycineksponering. Figuren er hentet fra [83].

mTORC1-komplekset er dannet av mTOR, regulatorisk assosiert protein av mTOR (raptor), GβL (mTOR-assosiert protein LST8 homolog) og Deptor (DEP domene med mTOR-interagerende protein) (Figur 54 A). Akkurat som komplekset får vekstsignaler fra aminosyrer og vekstfaktorer, kan det også få inhibitoriske signaler fra hypoksi (for lite tilgang til oksygen), lav energinivå og DNA-feil. De cellulære anabolske prosessene som settes i gang ved aktivering av mTOR omfatter mRNA-translasjon, ribosombiogenese og lipidsyntese samtidig som den hemmer autofagi og andre katabolske prosesser. Aktivering av mTORC1 sender også en negativ feedback til insulinreseptor som demper insulin-PI3K-signalering med alvorlige fysiologiske konsekvenser. Aminosyrer regulerer rekrutteringen av mTORC1 til den lysosomale overflaten hvor mTORC1 aktiveres. Ved mangel på aminosyrer, vil komplekset av den vakuolære H<sup>+</sup>-ATPase (v-ATPase)-Regulator og Rag GTPase være i inaktiv konformasjon og kan ikke binde seg til mTORC1 og rekruttere den. Aminosyrer virker delvis via en «inn-ut»-mekanisme ved å sende signaler til v-ATPase-Regulator-komplekset, og via den videre til Rag-GTPaser som skifter («switcher») sine nukleotidlasting og blir aktivert. Aktivert Rag-GTPaser rekrutterer så mTORC1 til den lysosomale overflaten hvor de små GTPase Rheb skrur på kinaseaktiviteten til mTORC1. Den aktive mTORC1 fosforylerer flere target, inkludert ribosomal protein S6-kinase (S6K), eukaryotisk initieringsfaktor 4E-bindende protein 1 (4E-BP1), autofagiregulatoren ULK1 og transkripsjonsfaktoren TFEB [81, 82]. Fosforylerte S6K og 4E-BP1 favoriserer proteinsyntese, fosforylering av ULK1 blokkerer autofagosomdannelse, og fosforylering av TFEB hindrer den fra å gå inn i cellekjernen og aktivere det katabolske transkripsjonsprogrammet [81] (Figur 54 B).



**Figur 54: A) mTOR-komplekset med dens oppstrøms og nedstrøms effekter.** mTORC1-komplekset består av mTOR, raptor og GβL. **B) Effekt av aminosyrer på mTORC1-aktivering ved lysosomal overflate.** Aminosyrer regulerer rekruttering av mTORC1 på lysosomal overflate hvor komplekset aktiveres. Figurene er hentet fra [81].

I humane og dyremuskelceller vil aktivering av mTORC1-signaleirngskaskade indusert av aminosyrer føre til økt muskelproteinsyntese og sannsynligvis til redusert autofagi. I humane muskelceller vil økningen i muskelproteinsyntese etter fordøyelse av aminosyrer vare i ca. 2-3 timer før den går tilbake til basale nivåer. Nyere studier har vist at det finns også en negativ regulator av mTORC1-rekruttering til lysosomal overflate. Når særlig aminosyretilgjengelighet er lav, aktiveres en subkompleks kalt GTPase-aktiverende protein [GAP] aktivitet mot Rager (GATOR1), som hemmer Rag heterodimerkomplekset i å rekruttere mTORC1 til lysosomal overflate. Denne inhiberingen av Rag GTPase-heterodimer fjernes av en annen proteinsubkompleks kalt GATOR2. Hemming av den inhibitoriske effekten til GATOR1 av GATOR2 kreves for aminosyreindusert mTORC1-aktivering. To intracellulære komponenter, som responderer på aminosyrer har nylig vært identifisert. Disse er leucyl-tRNA-syntase og v-ATPase som syns å være viktige for å fremme aminosyreindusert mTORC1-rekruttering. Leucyl-tRNA-syntase ser ut å være sensitiv mot intracellulær leucin (en essensiell aminosyre). Ved høye leucinkonsentrasjoner migrerer leucyl-tRNA-syntase til lysosomer, hvor den tilrettelegger riktig nukleotidlasting av Rag GTPase heterodimerkomplekset som igjen stimulerer mTORC1-aktivitet. v-ATPase derimot er lokalisert på lysosomal membran og er sensitiv mot aminosyreakkumulering inni lysosomer. I tillegg finns det en aminosyrettransportør på lysosomalmembran, kalt proton-assistert aminosyrettransportør (PAT) 1, som eksporterer aminosyrer fra lysosomal lumen til cytosol. Overuttrykk av PAT1 hemmer stimulering av mTOR ved tilstedeværelse av aminosyrer [52].

På bakgrunn av de nevnte effektene til aminosyretilgjengelighet på mTORC1, som syns å være en hovedregulator av proteinsyntese, cellevekst og cellyklusprogresjon, kan effekten av lav cystein på manglende differensiering av myoblaster forklares med dårlig tilgjengelighet på cystein, som antakelig fører til nedsatt rekruttering av mTORC1, som fører trolig igjen til nedsatt celledifferensiering.

For å kunne studere effekt av lav cystein, ble i tillegg til redusert konsentrasjon av cystein, også metioninkonsentrasjon redusert fra den normale konsentrasjonen på 200  $\mu\text{M}$  til 30  $\mu\text{M}$  i cysteintitreringsmedier [73, 74]. Siden metionin er en essensiell aminosyre og cystein regnes som en semiessensiell aminosyre for den kan syntetiseres fra metionin [9, 53], kan disse to aminosyrene ikke heller syntetiseres av selve cellene og må tilføres cellene ekstracellulært [49]. Det kan derfor tenkes at effekt på differensiering av myoblaster i testceller kan også skyldes lav metioninkonsentrasjon når sammenlignet med kontrollceller. En studie i celler fra H4IIE-cellelinje (fra rottelever) har vist at i tillegg til leucin, er også metionin i stand til å regulere S6K, fosforylering av hvilken favoriserer proteinsyntese [81, 82, 85]. Men siden konsentrasjon av metionin var det samme i alle testceller behandlet med økende cysteinkonsentrasjoner, kan den økende differensieringen med økende cysteinkonsentrasjon i disse celler (testceller) utelukkes til effekt av lav cystein. I tillegg påvirker også aminosyretilgjengelighet uttrykk av aminosyretransportører i humane skjelettmuskelceller, som er viktige for aminosyreopptaket i cellene [52]. Funnene i denne oppgaven tyder derfor på at både redusert cystein og redusert metionin fra dag 0 av differensiering kan for det første ha ført til redusert uttrykk av aminosyretransportører i disse cellene, som igjen fører til redusert opptak av disse aminosyrene inni cellen. For det andre kan redusert cystein og metionin inni cellen videre ha ført til hemming av mTORC1-aktivitet, som igjen kan ha ført til hemmet cellevekst/celledifferensiering. Når differensiering initieres ved å fjerne/ redusere vekstfaktor [skifte fra høy (20 %) til lav (2 %) serumkonsentrasjon], slutter myoblaster å proliferere, går ut av cellyklusen og induserer uttrykk av myogenin som er en differensieringsmarkør [28]. Når både cystein- og metioninkonsentrasjon reduseres, samtidig som differensiering induseres, kan dette trolig føre til at differensieringen av myoblaster til myotuber blir hemmet. Flere studier har vist at aminosyren leucin, som er en av de essensielle aminosyrene, spiller en sentral rolle i regulering av mTOR i skjelett- og fettceller [85, 86], i stimulering av proteinsyntese i skjelettmuskel [87] og i gjenoppretting av skjelettmuskel [88]. Cystein og metionin kan muligens også ha lignende effekter som bør studeres nærmere.

Ut fra de morfologiske observasjonene var det forventet at Myog, Mef2c og Myod1, som er viktige markører av differensiering [26, 28, 30], skulle påvirkes av cystein. Dette ble ikke observert hos Sol8-celler, men en signifikant hemming ( $p < 0,01$ ) av Mef2c-uttrykk ble observert hos C2C12 celler med lave cysteinkonsentrasjoner (Figur 46), noe som kan forklare effekten på differensiering i disse celler. I Sol8 celler ble det vist signifikant lavere uttrykk ( $p < 0,05$ ) av Myod1 i testceller behandlet med 20 og 30  $\mu\text{M}$  cystein i forhold til 100  $\mu\text{M}$  cystein (Figur 44 og Figur 46). Forskjellen mellom 15 og 100  $\mu\text{M}$  cystein var imidlertid ikke signifikant, noe som antakelig skyldes en tilfeldighet. Hemming av Myod1-uttrykk i Sol8 celler kan trolig forklare effekten på differensiering i disse celler. Generelle funn fra genekspresjonsforsøkene viste ikke mye forandring i noen av de viktigste transkripsjonsfaktorene for muskeldifferensiering, men det er også mulig at andre viktige transkripsjonsfaktorer som ikke ble undersøkt i denne oppgaven er påvirket av lav cystein. Lav cystein hadde også liten påvirkning på uttrykk av muskelfibergener. Resultatene kan tyde på at lav cystein ikke påvirker proteinsyntese i stor nok grad, men det er progresjon av cellesyklus og cellevekst som antakelig blir hemmet ved lave cystein- og eventuelt metioninkonsentrasjoner. Der er også mulig at cystein egentlig hemmer fusjonering av myoblaste til myotuber, som bør studeres nærmere. Signifikant lavt uttrykk av Myh1, Myh 2 og Myh4 i C2C12 celler derimot skyldes mest sannsynlig ikke effekt av lav i forhold til høy cystein, men at her var de laveste konsentrasjonene (5 og 10  $\mu\text{M}$  cystein) enda lavere enn vist ved cysteininsuffisiens (cysteinmangel) [9]. Uttrykk av Myh7 derimot ble påvirket av lave cysteinkonsentrasjoner (10, 15, 20 og 30  $\mu\text{M}$ ) i forhold til høy (100  $\mu\text{M}$ ) hos både Sol8 og C2C12 celler (mest hos C2C12), noe som kan tyde på at lav cysteinkonsentrasjon har også en effekt på utvikling av myoblaste til muskelfibertype, siden Myh7 uttrykkes i langsomme (type I) muskelfibrer, mens Myh1, Myh2 og Myh4, som ikke er påvirket signifikant, uttrykkes i raske (type II) muskelfibrer (Figur 6) [30]. Identifisering av transkripsjonsfaktorer som regulerer disse genene kan derfor være av interesse for å forstå effekten av lav cystein. Ellers har resultater fra genekspresjonsforsøkene vist omtrent samme mønster av genuttrykk av muskelfibergener og differensieringsmarkører både hos Sol8- og C2C12-celler. Den sterke nedgangen i Myh4-uttrykk hos Sol8-testceller i forhold til kontrollcellene kan enten skyldes forskjellen mellom de to mediene (vanlig differensieringsmediet og cysteintitreringsmediet) eller effekt av lav cystein. Noen av forskjellene mellom de to mediene, bortsett fra den lave konsentrasjonen til metionin og cystein i cysteintitreringsmediet, var at cysteintitreringsmediet i tillegg manglet HEPES-buffert og hadde en annen konsentrasjon av bikarbonat. Ellers hadde de samme sammensetningene av aminosyrer, vitaminer, uorganiske

salter, glukose og fenolrødt [73, 74]. Det er mer sannsynlig at den store nedreguleringen i Myh4 hos Sol8 cellene skyldes effekt av lav cystein og metionin, ikke forskjell mellom de to mediene, noe som tyder på at lav cystein/metionin fører til sterk nedregulering av genet Myh4 hos Sol8 celler. Denne nedreguleringen er derimot ikke like sterk hos C2C12 cellene, noe som tyder på ulik sammensetning av muskelfibertyper i disse to cellelinjene.

## 6.4 Isolering av lipiddråper

I denne oppgaven var formålet med isolering av lipiddråper fra myotuber behandlet med to ulike cysteinkonsentrasjoner fra dag 3 av differensiering todelt: For det første å undersøke morfologisk om lav cystein hadde effekt på mengde lipiddråpe akkumulert i myotuber sammenlignet med celler behandlet med høy cystein. Det andre formålet med lipiddråpeisolering var å etablere en teknikk for isolering av høyrensede lipiddråper med minimal forurensning av andre celle fraksjoner. De isolerte lipiddråpene kunne deretter analyseres for å undersøke hva effekten av lav mot høy cystein på lipiddråpene kunne skyldes. Lipidkomponenter i lipiddråpene kunne for eksempel detekteres med tynnsjikt-kromatografi, og lipiddråpeassosierte proteiner kunne detekteres med Western blotting. I denne oppgaven ble det ikke tilstrekkelig tid til å analysere isolerte lipiddråper, men det ble i hvert fall testet ut og etablert en teknikk for isoleringen.

For effektiv lipiddråpeisolering er hulldannesle i cellemembraner med nitrogenbombe spesielt effektiv for lysing av celler samtidig som selve lipiddråper beholdes intakt [72]. På bakgrunn av dette ble celleprøver i denne oppgaven lysert i nitrogenbombe etter høsting under nitrogentrykk på 650-700 psi (pounds per square inch) for 20 minutter. På Figur 47 **A**, som er tatt av celleprøven før nitrogenkavitasjon, og Figur 47 **B**, som er tatt av samme prøve etter nitrogenkavitasjon, er effekt av nitrogenkavitasjon bedre synlig enn på Figur 48. At denne effekten ikke er like godt synlig i Figur 48 kan mest sannsynlig være tilfeldig og kan skyldes fotograferingen, for eksempel hvor bildet er tatt.

Etter nitrogenkavitasjon kan cellekjerner fjernes ved lavhastighets sentrifugering [72].

Prøvene ble derfor sentrifugert ved 3000 rpm for 10 minutter for å fjerne cellekjerner, som ble samlet på bunnen som en pellet. En kortvarig lavhastighets sentrifugering kan raskt flyte lipiddråper opp, men andre cellekomponenter, spesielt mitokondrier kan følge med dem [72]. For isolering av rene lipiddråper med minimal kontaminasjon av cellulære membraner og

spesielt mitokondrier er derfor en kortvarig lavhastighets sentrifugering ikke nok. Derfor ble det i denne oppgaven brukt tetthetsgradient ultrasentrifugering med sukrose, som er en metode for isolering av høyrensedede lipiddråper med minimal forurensning av andre cellekomponenter. Når lipiddråper får flyte opp på toppen av sentrifugerøret gjennom to lag med sukrose gradient, blir de renset bedre enn om de kun sentrifugeres. Effekt av denne teknikken vises best i Figur 48 **C**, som viser lipiddråper før tetthetsgradient sentrifugering og Figur 48 **D**, som viser lipiddråper etter tetthetsgradient sentrifugering. Figuren viser tydelig at det finns andre forurensninger i tillegg til selve lipiddråper i prøven før tetthetsgradient ultrasentrifugering, mens etter tetthetsgradient ultrasentrifugering syns ikke lipiddråpene å være nevneverdig forurenset med andre kontaminanter. At samme effekt er ikke synlig på Figur 47 **C** og **D** skyldes mest sannsynlig at prøven i **C** var ikke blandet godt og homogenisert før applisering i petriskål med glassbunn før fotografering. På både Figur 47 og Figur 48 **E**, som er tatt fra skillelaget mellom gradientene etter ultrasentrifugering, og **F**, som er tatt fra pelleten etter ultrasentrifugering oppløst i Buffer A, syns det nesten ingen lipiddråper, noe som tyder på god effektivitet med denne lipidisoleringsmetoden og et optimalt utbytte.

Når det gjelder forskjellen i antall og/eller størrelse til lipiddråpene mellom celler behandlet med 10  $\mu\text{M}$  i forhold til 100  $\mu\text{M}$  cystein fra dag 3 av differensiering, kan det utfra observering av Figur 47 og Figur 48 **D** igjen se ut til at lav cystein kan ha en effekt på lagring av lipiddråper, ved at størrelsen på lipiddråper i celler dyrket med lav cystein ser ut til å være noe mindre. Det er viktig å påpeke at det kan ikke med sikkerhet sies om lipiddråpene i celler på Figur 48 **D** er større enn lipiddråper i celler på Figur 47 **D** uten å ha analysert dette nærmere. Det kan for eksempel være slik at en stor grønn prikk som ser ut til å være en stor lipiddråpe egentlig er en ansamling av flere lipiddråper som sitter sammen. Antallet lipiddråper i Figur 48 **D** i forhold til Figur 47 **D** kan igjen skyldes mer celleprolifisering i celler på Figur 48 på grunn av høyere cysteinkonsentrasjon.

## 6.5 Veien videre

Videre studier er nødvendig for å finne ut om hvilke mekanismer som medfører at lav cystein påvirker differensiering av myoblaster. Dette kan forskes for eksempel ved genekspresjonsstudier av andre gener som har betydning for celleprolifisering, celleoverlevelse og celledifferensiering.

For å undersøke ytterligere om cystein kan ha en effekt på lagring av lipiddråper kan det prøves med for eksempel endring av forsøksoppsett, som senere initiering av cysteintitrering eller cysteintitrering kun i et døgn. Effekt av cystein på akkumulering av lipiddråper kan også undersøkes i andre celletyper som for eksempel i adipocytter eller andre typer myocytter.

Videre kan en eventuell effekt undersøkes ved analysing av lipiddråper ved for eksempel detektering av lipidkomponenter i selve lipiddråpene eller proteinene på overflaten.

## 7 Konklusjon

Eksperimentene hvor det ble undersøkt om lav cystein påvirker lagring av lipiddråper i myoblaster viste at lav cystein ikke hadde en direkte effekt på total mengde lipiddråper akkumulert i myotuber, men at lav cystein muligens førte til nedsatt celleprolifisering og celleoverlevelse. Lav cystein påvirker muligens også lipiddråpestørrelse.

Eksakt mekanisme for hvordan lav cystein påvirker differensieringen av myoblaster til myotuber er ikke klarlagt, men funnene ved denne masteroppgaven viser at lav cysteinkonsentrasjon fra dag 0 av differensiering påvirker differensiering av Sol8 celler antakelig ved å hemme uttrykk av Myod1, mens hos C2C12 cellene ble differensieringen trolig påvirket ved hemming av Mef2c-uttrykk. De andre differensieringsmarkørene i disse cellelinjene, som ble undersøkt i denne oppgaven, syns ikke å bli påvirket av lav cysteinkonsentrasjon. Det ble også vist at lav cysteinkonsentrasjon fra dag 0 av differensiering påvirker uttrykk av Myh7 i både Sol8 og C2C12 celler ved å oppregulere uttrykk av dette genet. De andre muskelfibergenene studert i denne oppgaven syns ikke å bli påvirket av lav cysteinkonsentrasjon i stor nok grad.

Nitrogenkavitasjon av celler i nitrogen bombe viste å være en velegnet metode for lysing av celler under isolering av lipiddråper. For isolering av høyrensede lipiddråper med minimal forurensning med andre cellekomponenter, viste ultrasentrifugering av prøve med tetthetsgradient av sukrose å være en velegnet og effektiv teknikk.



## 8 Litteraturliste

1. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: s. 687-714.
2. Aarskog, D. and R. Bjerknes, *Overvekt og fedme hos barn og unge*. Pediatrisk endokrinologi, 2004. **18**: s. 6-23.
3. *Overvekt og fedme hos voksne - faktaark med statistikk*. 2015 [sitert 2015 22. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no/tema/overvekt-og-fedme/overvekt-hos-voksne>.
4. *Overvekt og fedme* 2015 [sitert 2015 22. april]; Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/livsstil/kosthold/overvekt/overvekt-og-fedme-1147.html>.
5. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2006 [sitert 2015 17. april]; Tilgjengelig fra: [http://www.idf.org/webdata/docs/IDF\\_Meta\\_def\\_final.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf).
6. Despres, J.-P., *Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?* Annals of medicine, 2006. **38**(1): s. 52-63.
7. Ronnett, G.V., et al., *Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment*. Physiology & behavior, 2005. **85**(1): s. 25-35.
8. *Forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme* 2010 [sitert 2015 22. april]; Tilgjengelig fra: <https://helsedirektoratet.no/retningslinjer>.
9. Elshorbagy, A.K., et al., *Cysteine and obesity*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(3): s. 473-81.
10. Elshorbagy, A.K., et al., *Homocysteine, cysteine, and body composition in the Hordaland Homocysteine Study: does cysteine link amino acid and lipid metabolism?* Am J Clin Nutr, 2008. **88**(3): s. 738-46.
11. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. The Lancet, 2005. **365**(9468): s. 1415-1428.
12. Alberti, K., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome —a new world - wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation*. Diabetic medicine, 2006. **23**(5): s. 469-480.
13. *Metabolsk syndrom*. 2011 [sitert 2015 16. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/diabetes/11.komplikasjoner/11.2-diabetes-og-makro/11.2.1-metabolsk-syndrom>.
14. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(4): s. 295-309.
15. Alberti, K., et al., *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care, 1998. **21**: s. S5.
16. *Fakta om diabetes*. 2014 [sitert 2015 22. april]; Tilgjengelig fra: [http://www.diabetes.no/no/Om\\_diabetes/](http://www.diabetes.no/no/Om_diabetes/).
17. Fowler, M.J., *Microvascular and macrovascular complications of diabetes*. Clinical diabetes, 2008. **26**(2): s. 77-82.
18. Rains, J.L. and S.K. Jain, *Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **50**(5): s. 567-575.
19. Khan, A. and J. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): s. 1475-1483.
20. Watt, M.J., *Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance?* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009. **36**(1): s. 5-11.

21. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function*. Lipids Health Dis, 2012. **11**(30): s. 1-11.
22. Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. Metabolism, 2010. **59**(1): s. 70-85.
23. Ten Broek, R.W., S. Grefte, and J.W. Von den Hoff, *Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration*. Journal of cellular physiology, 2010. **224**(1): s. 7-16.
24. Sand, O., et al., *Menneskets fysiologi*. 1 ed. Skjelettmuskulatur. Vol. 3. 2001: Glydendal Norsk Forlag AS.
25. Dhawan, J. and T.A. Rando, *Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment*. Trends in cell biology, 2005. **15**(12): s. 666-673.
26. Buckingham, M. and D. Montarras, *Skeletal muscle stem cells*. Current opinion in genetics & development, 2008. **18**(4): s. 330-336.
27. Zammit, P.S., T.A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, *The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2006. **54**(11): s. 1177-1191.
28. Walsh, K. and H. Perlman, *Cell cycle exit upon myogenic differentiation*. Current opinion in genetics & development, 1997. **7**(5): s. 597-602.
29. Buckingham, M., *Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates*. Current opinion in genetics & development, 2006. **16**(5): s. 525-532.
30. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. Physiological reviews, 2011. **91**(4): s. 1447-1531.
31. Rennie, M.J. and K.D. Tipton, *Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: s. 457-83.
32. Scott, W., J. Stevens, and S.A. Binder-Macleod, *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Physical therapy, 2001. **81**(11): s. 1810-1816.
33. Zierath, J.R. and J.A. Hawley, *Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties*. PLoS biology, 2004. **2**(10): s. e348.
34. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(12): s. 5755-5761.
35. B, A., et al., *Molecular Biology of the Cell*. How cells obtain energy from food. Vol. 4. 2002, New York: Garland Science.
36. El Bacha, T., M. Luz, and A. Da Poian, *Dynamic adaptation of nutrient utilization in humans*. Natl Educ, 2010. **3**: s. 8.
37. Guo, Y., et al., *Lipid droplets at a glance*. Journal of cell science, 2009. **122**(6): s. 749-752.
38. Kimmel, A.R., et al., *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. Journal of lipid research, 2010. **51**(3): s. 468-471.
39. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): s. 2679-2690.
40. Hsieh, K., et al., *Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets*. Journal of cell science, 2012. **125**(17): s. 4067-4076.

41. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): s. 942-949.
42. Jocken, J.W. and E.E. Blaak, *Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity*. Physiology & behavior, 2008. **94**(2): s. 219-230.
43. Nakajima, K., et al., *Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(15): s. 1306-1318.
44. Wang, S., et al., *Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism*. Molecular genetics and metabolism, 2008. **95**(3): s. 117-126.
45. Koonen, D.P., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2005. **1736**(3): s. 163-180.
46. Holloway, G., et al., *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview*. Acta physiologica, 2008. **194**(4): s. 293-309.
47. Zhang, L., et al., *Role of fatty acid uptake and fatty acid  $\beta$ -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(1): s. 1-22.
48. Talanian, J.L., et al., *Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2010. **299**(2): s. E180-E188.
49. Aminosyrer. 2009 [sitert 2015 26. april]; Tilgjengelig fra: <https://snl.no/aminosyrer>.
50. Biolo, G., et al., *Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1995. **268**(1): s. E75-E84.
51. Hundal, H.S. and P.M. Taylor, *Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2009. **296**(4): s. E603-E613.
52. Dickinson, J.M. and B.B. Rasmussen, *Amino Acid Transporters in the Regulation of Human Skeletal Muscle Protein Metabolism*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(6): s. 638-44.
53. Stipanuk, M.H., *Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine*. Annu. Rev. Nutr., 2004. **24**: s. 539-577.
54. Reflection 3- The Powerful Proteins!!! 2014 [sitert 2015 26. april]; Tilgjengelig fra: <https://biochemistry3rst.wordpress.com/tag/biochemistry/>.
55. El-Khairi, L., et al., *Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study*. The American journal of clinical nutrition, 1999. **70**(6): s. 1016-1024.
56. Aasheim, E.T., et al., *Effect of bariatric surgery on sulphur amino acids and glutamate*. British Journal of Nutrition, 2011. **106**(03): s. 432-440.
57. Elshorbagy, A.K., et al., *Cysteine and obesity: consistency of the evidence across epidemiologic, animal and cellular studies*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(1): s. 49-57.
58. Bakke, S.S., et al., *Palmitic acid follows a different metabolic pathway than oleic acid in human skeletal muscle cells; lower lipolysis rate despite an increased level of adipose triglyceride lipase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2012. **1821**(10): s. 1323-1333.
59. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta physiologica Scandinavica, 2005. **183**(1): s. 31-41.

60. *ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation User Guide*. 2002 [sitert 2015 7. april]; Tilgjengelig fra: [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041216.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041216.pdf).
61. *Isolation of Total RNA from Cultured Cells, Chemistry on the ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid PrepStation, Quick Reference Card*. 2002 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041285.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041285.pdf).
62. *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*. 2015 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <https://www.takeitapart.com/guide/66>.
63. *NanoDrop ND-2000*. [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.isogen-lifescience.com/nanodrop-2000>.
64. *NanoDrop ND-2000c*. 2015 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticleDetails&wich=91-ND-2000c>.
65. *Reverse Transcription Protocol*. 2015 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <https://www.lifetechnologies.com/no/en/home/life-science/pcr/elevate-pcr-research/reverse-transcription-essentials.html>.
66. *Techniques of Molecular Biology*. 2013 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <http://10e.devbio.com/article.php?id=32&search=Method> for preparing complementary DNA.
67. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. 2005.
68. *INTRODUKSJONSGUIDE TIL PCR*. [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: [http://www.kptkomet.no/uploads/media/Introduksjon\\_til\\_PCR-NORSK.pdf](http://www.kptkomet.no/uploads/media/Introduksjon_til_PCR-NORSK.pdf).
69. *Påvisning av næringsmiddelpatogener med PCR, Prinsipper for real-time PCR*. 2006 [sitert 2015 14. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.ffi.no/no/Rapporter/06-03900.pdf>.
70. Nyborg, B.S., *Undervisning i bioteknologi: muligheter og utfordringer*. 2008.
71. Kornberg, R.D., *The molecular basis of eukaryotic transcription*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(32): s. 12955-12961.
72. Brasaemle, D.L. and N.E. Wolins, *Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation*. Current protocols in Cell Biology, 2006: s. 3.15. 1-3.15. 12.
73. *DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM [DME]*. 2007 [sitert 2015 01. mai]; Tilgjengelig fra: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/d5648pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/d5648pis.pdf).
74. *21013 - DMEM, high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine*. 2015 [sitert 2015 01. mai]; Tilgjengelig fra: <http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/technical-resources/media-formulation.43.html>.
75. Spangenburg, E.E., et al., *Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle*. BioMed Research International, 2011. **2011**.
76. Krahmer, N., et al., *Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase*. Cell metabolism, 2011. **14**(4): s. 504-515.
77. Dalen, K.T., et al., *LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(2): s. 210-227.

78. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791**(6): s. 419-440.
79. Koopman, R., G. Schaart, and M.K. Hesselink, *Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids*. Histochemistry and cell biology, 2001. **116**(1): s. 63-68.
80. *RIPA Buffer*. 2015 [sitert 2015 07. april]; Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0278?lang=en&region=NO>.
81. Efeyan, A., R. Zoncu, and D.M. Sabatini, *Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(9): s. 524-533.
82. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. Genes & development, 2002. **16**(12): s. 1472-1487.
83. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): s. 274-293.
84. *Rapamune*. 2015 [sitert 2015 24. april]; Tilgjengelig fra: <http://felleskatalogen.no/medisin/rapamune-pfizer-563245>.
85. Lynch, C.J., *Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies*. The Journal of nutrition, 2001. **131**(3): s. 861S-865S.
86. Anthony, J.C., et al., *Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(10): s. 2413-2419.
87. Anthony, J.C., et al., *Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation*. The Journal of Nutrition, 2000. **130**(2): s. 139-145.
88. Anthony, J.C., T.G. Anthony, and D.K. Layman, *Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise*. The Journal of nutrition, 1999. **129**(6): s. 1102-1106.

## 9 Vedlegg

### 9.1 Medier og stockløsninger til celledyrking

#### 9.1.1 50x Stock miks/Vitaminmiks (200 mL)

Reagens	Mengde/Volum	Slutt konsentrasjon
HEPES	59,58 g	5,958 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	15 g	1,5 g/L
Natriumpyruvat	1,1 g	0,11 g/L
MilliQ H <sub>2</sub> O	~200 mL	

Varmes til 37 °C for å løse. pH justeres til 7,4 ved 37 °C. Lagres ved -20 °C.

#### 9.1.2 Basalmedium (1 L)

Reagens	Mengde/Volum
DME med høy glukose (4500 mg/L) og L-Glutamin	1 L (tørrstoff)
50x Stock miks/Vitaminmiks	20 mL
MilliQ H <sub>2</sub> O	~980 mL

Sterilfiltreres. Lagres ved 4 °C.

#### 9.1.3 Vekstmedium (200 mL)

Reagens	Volum
Basalmedium	200 mL
Føtal bovint serum (FBS)	40 mL
Penicillin-Streptomycinløsning	2 mL
L-Glutamin	2 mL

Blandes godt. Lagres ved 4 °C.

#### 9.1.4 Frysemedium (10 mL)

Reagens	Volum
Vekstmedium	9 - 8,5 mL
Dimetylsulfoksid (DMSO)	1 - 1,5 mL

Blandes godt. Brukes samme dag.

### 9.1.5 Vanlig differensieringsmedium (200 mL)

Reagens	Volum
Basalmedium	200 mL
Hesteserum	4 mL
Penicillin-Streptomycinløsning	2 mL
L-Glutamin	2 mL

Blandes godt. Lagres ved 4 °C.

### 9.1.6 L-Metionin (20 mM stockløsning)

Reagens	Mengde/Volum
L-Metionin	41,95 g
MilliQ H <sub>2</sub> O	14,06 mL

Blandes godt og sterilfiltreres. Lagres ved 4 °C.

### 9.1.7 L-Cystin (10 mM stockløsning)

Reagens	Mengde/Volum
L-Cystin	30,98 g
MilliQ H <sub>2</sub> O	12,70 mL
HCl	180 µL

Varmes til 60 °C for ~30 minutter for å løse. Avkjøles og sterilfiltreres. Lagres ved 4 °C.

### 9.1.8 Natriumpyruvat (1 M stockløsning)

Reagens	Mengde/Volum
Na-pyruvat	1,98 g
MilliQ H <sub>2</sub> O	18,0 mL

Blandes godt og sterilfiltreres. Lagres ved 4 °C.

### 9.1.9 Differensieringsmedier til cysteintitrering (200 mL)

Reagens	Volum
DMEM ([–] L-Metionin og L-Cystin)	200 mL
Hesteserum	4 mL
Penicillin-Streptomycinløsning	2 mL
L-Glutamin	2 mL
L-Metionin 20 mM stockløsning	300 µL
(Natriumpyruvat 1 M stockløsning)*	(200 µL)*
L-Cystin 10 mM stockløsning	50-1000 µL

Blandes godt. Lagres ved 4 °C.

\* Ble sløyet i noen forsøk.

## 9.2 Stockløsninger til LD-stimulering med OA

### 9.2.1 BSA (Bovint Serum Albumin) (2,4 mM stockløsning)

Reagens	Mengde/Volum
Bovint serum albumin (BSA)	5 g
MilliQ H <sub>2</sub> O	28 mL
NaOH 5 M stockløsning	210 µL

Blandes forsiktig for å løse. Brukes videre til å lage OA-BSA stockløsning. Resten lagres ved -20 °C.

### 9.2.2 OA-BSA stockløsning (6 mM OA + 2,4 mM BSA)

Reagens	Mengde/Volum
Oljesyre (OA)	42,8 mg
BSA 2,4 mM stockløsning	25,3 mL
NaOH 0,1 M stockløsning	1,52 µL

Varmes til 50 °C for 5 minutter for å løse og blandes forsiktig. Avkjøles og sterilfiltreres.

Lagres ved -20 °C.

## 9.3 Reagenser til fiksering og farging

### 9.3.1 Paraformaldehyd 4 % (500 mL)

350 mL dH<sub>2</sub>O varmes til 60 °C i avtrekksskap  
Paraformaldehyd tilsettes til 4 % (21 g for 95 % PFA pulver)  
under oppvarming og røres (skal ikke overvarmes)  
2 M NaOH tilsettes dråpevis til løsningen blir nesten klar  
Løsningen fjernes fra varmen  
50 mL 10x PBS tilsettes  
pH justeres til 7,2 med HCl  
dH<sub>2</sub>O tilsettes til sluttvolum (500 mL)  
Løsningen filtreres for å fjerne ikke-løste partikler  
Avkjøles til romtemperatur  
Lagres ved -20 °C.

### 9.3.2 Oil Red O løsning (100 mL)

Reagens	Mengde/Volum
Oil Red O	0,5 g
Isopropanol	100 mL

Blandes veldig forsiktig etter en stund for å løse (ikke alt vil løse seg). Filtreres gjennom

Watman-papir (for eksempel) for å fjerne ikke-løste partikler. Brukes umiddelbart til farging.



## 9.4 Reagenser til proteinmåling

### 9.4.1 25 x Complete stock (400 µL)

Reagens	Mengde/Volum
Complete Mini	1 tablett
MilliQ H <sub>2</sub> O	400 µL

Løses godt. Lagres ved -80 °C.

### 9.4.2 RIPA-buffer (100 mL)

Reagens	Stock konsentrasjon	Volum	Slutt konsentrasjon
Tris-HCl	1 M, pH 7.4	5 mL	50 mM
NaCl	5 M	3 mL	150 mM
Fysiologisk NaOH er 150 mM			
NP-40	25 % (i H <sub>2</sub> O)	4 mL	1 %
Natriumdeoksykolat (rensemiddel)	10 %	5 ml	0,5 %
SDS	20 %	0,5 ml	0,1 %
EDTA (Chelateringsmiddel; binder til metaljoner som Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> )	0,5 M EDTA	4 ml	2 mM
MilliQ H <sub>2</sub> O	-	78,5 ml	-

Løses godt. Lagres ved 4 °C.

### 9.4.3 Lyseringsbuffer med RIPA og Complete (1 mL)

Reagens	Volum
RIPA-lyseringsbuffer	960 µL
25 x Complete stock	40 µL

Blandes godt. Lagres ved -80 °C.

## 9.5 Primere til qRT-PCR med SYBR<sup>®</sup> Green 1

Gen	Forward primer	Revers primer	Amplikon størrelse
TBP	AGCCTTCCACCTTATGCTCAG	GCCGTAAGGCATCATTGGACT	90
Plin2	GGGCTAGACAGGATGGAGGA	CACATCCTTCGCCCCAGTTA	99
Myh1	TGATCAATGAGCTGACTGCG	TTTCGTCTAGCTGGCGTGA	75
Myh2	TAGTGGTGGAGCTGCCAAGAA	GCTCCTGAGATTGGTCATCAGC	109
Myh3	CAGGGGCAAGAATGAGGAGAT	CTTCTAGTTGACGACTCAGCTC	101
Myh4	ATGACCAGGAAGAGCTGATGG	ACCTTTTCATCTGCACTGAATCC	70
Myh7	CTGACGCAGGAGAGCATCAT	CAATCCTGGCATTGAGTGCAT	103
Myod1	GCGCTCCAAGTCTCTGATG	CGGTGTCGTAGCCATTCTGC	80
Myog	GGCAATGCACTGGAGTTCG	AGATTGTGGGCGTCTGTAGG	74
Pax7	TCCAACCACATGAACCCTGTC	CACTCGGGTTGCTAAGGATG	70
Myf5	AGCAGCTTTGACAGCATCTACT	CCGATCCACAATGCTGGACA	102
Mef2c	AGCAGCAGCACCTACATAACA	TGAGTAGAAGGCAGGGAGAGAT	106

## 9.6 Reagenser til LD-isolering

### 9.6.1 Tricin 1 M stockløsning (50 mL)

8,96 g Tricin veies

30 mL Milli-Q-vann tilsettes, blandes og mikses godt på virvelmikser

pH justeres til 7,6 med 10 M NaOH

ved å tilsette NaOH litt og litt og måle pH underveis (totalt ~970 µL 10 M NaOH)

Milli-Q-vann tilsettes til ~50 mL og pH måles på nytt

Mer Milli-Q-vann tilsettes dråpevis til akkurat 50 mL

### 9.6.2 5x Buffer A (50 mL)

Reagens	Mengde/Volum
Sukrose	21,4 g
MilliQ H <sub>2</sub> O	40 mL
Tricin 1 M stockløsning	6,25 mL

Blandes og mikses godt på virvelmikser. Lagres ved 4 °C.

### 9.6.3 Buffer B uten sukrose (50 mL)

Reagens	Stock konsentrasjon	Volum	Slutt konsentrasjon
HEPES	500 mM, pH 7.4	2 mL	20 mM
KCl	2 M	2,5 mL	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 M	50 µL	2 mM
MilliQ H <sub>2</sub> O		~50 mL	

Blandes godt. Lagres ved 4 °C.

### 9.6.4 Buffer B med sukrose (50 mL)

Reagens	Stock konsentrasjon	Volum	Slutt konsentrasjon
HEPES	500 mM, pH 7.4	2 mL	20 mM
KCl	2 M	2,5 mL	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 M	50 µL	2 mM
Sukrose			4 %
MilliQ H <sub>2</sub> O		~50 mL	

Blandes godt. Lagres ved 4 °C.

### 9.6.5 1x PBS med 1x Complete (20 mL)

Reagens	Mengde/Volum
Complete Mini	2 tabletter
PBS	20 mL

Løses godt. Lagres ved -80 °C.